

## 明 細 書

改変DNA分子、それを有する組み換え体、およびその利用

### Technical Field

本発明は、真核細胞（真核細胞からなる生物を含む）内で発現した場合に糖鎖付加なしの蛋白質を生成することのできる、原核細胞（原核細胞からなる生物を含む）由来の改変された遺伝子、及びその利用に関する。

### Background

従来、細菌や藍藻のような原核細胞遺伝子産物を得る方法として、当該遺伝子を有する原核細胞を培養し目的の遺伝子産物を単離精製する方法が一般的であった。しかし、この方法により得られた遺伝子産物をワクチンとして用いる場合、十分な発現量が確保できないという生産効率の問題や、精製段階で発熱物質などの不純物の除去が困難であるため安全上の問題が生じていた。

そこで、発熱物質除去の必要が生じない利点に着目し、ウイルスなどのベクターに目的の原核細胞由来の遺伝子を組み込んだ組み換えベクターを真核細胞内に導入し、直接真核細胞内で遺伝子を発現させることが検討されていた。しかしながら、原核細胞と真核細胞とは、遺伝子発現の様式が根本的に異なるため、真核細胞内で発現された原核細胞遺伝子産物が、原核細胞が産生するのと同じレベルの活性を発揮できず、十分な免疫原性が得られない場合があった。

例えば、米国特許第5871742号公報には、マイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原遺伝子TTM-1（TTM-1遺伝子）を組み込んだアビポックスウイルスベクターが、マイコプラズマ・ガリセプティ

カム感染を防御するワクチンとして有効であることが示されている。その後、TTM-1遺伝子が原核細胞内で発現した場合は細胞膜表面にTTM-1遺伝子産物（TTMG-1抗原）が呈示（display）されるのに、真核細胞内で発現されたTTM-1産物は真核細胞膜表面に呈示されないために、本来の免疫原性を発揮していない可能性のあることが判明した。そして更なる研究の結果、TTM-1産物を真核細胞膜表面に呈示させるため、当該遺伝子に、マレックウイルス（MDV）のgBのシグナル配列（以下、MDVgBシグナルということがある）などのウイルス由来のタイプIIシグナル配列をコードするDNAを連結させた融合遺伝子が作製された。この融合遺伝子をアビボックスウイルスに組み込み、発現させることにより、細胞膜表面にTTM-1抗原を呈示させることに成功し、より高い感染防御活性を示すワクチンを得ている（国際公開第W097/36924号公報）。

ところで、真核細胞で合成された蛋白質は、多くの場合、糖鎖が付加される点で原核細胞と異なる。

Yoshidaら（2000）は、TTM-1遺伝子ではない別のマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の遺伝子であるmgc3（mgc3遺伝子）をアビボックスウイルスに組み込んだ組み換えアビボックスウイルスを作製し、そのmgc3遺伝子産物（MGC3抗原）の発現を免疫沈降により検討した。その結果、MDVgBシグナルを付加しないMGC3抗原はN結合型糖鎖が付加（N-グリコシル化）されないのに対し、MDVgBシグナルを付加した場合、MGC3抗原にN-グリコシル化されることが確認された。また、Yoshidaら（2000）は、mgc3遺伝子とMDVgBシグナルをコードするDNAとの融合遺伝子を組み込んだ組み換えアビボックスウイルスが産生するMGC3融合蛋白質は、抗原遺伝子mgc3のみを組み込んだ組み換えアビボックスウイルスが産生するMGC3抗原よりも、MGC3蛋白質を認識するマウスモノクローナル抗体35A6に対する

反応性が50倍に高まることを確認している。このことから、MDVgBシグナルをコードするDNAを原核細胞由来の抗原遺伝子と融合させることにより、得られる蛋白質に糖が付加されるものの、N-グリコシル化が免疫原性に影響を及ぼすことなく高い免疫原性の蛋白質が得られると考えられていた。

#### DISCLOSURE OF INVENTION

しかしながら、本発明者らは、Yoshidaら（2000）に従って、MDVgBシグナルをコードするDNAを付加したマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原遺伝子を組み込んだ組み換えウイルスを実際にニワトリに接種した動物実験を行ったところ、MDVgBシグナルをコードするDNAを付加しなかった場合と比較して、格別な感染防御効果の向上が認められないことを確認した。

この結果から、シグナルをコードするDNAを付加した融合遺伝子を用いても、必ずしも免疫原性を向上させるとは限らないことが判った。

そこで、発明者らは免疫原性が向上した新たなワクチンを得るべく鋭意検討した結果、原核生物が本来発現している筈の抗原蛋白質、即ち、N-グリコシル化のされていない抗原蛋白質が高い免疫原性を与えることを見だし、本発明を完成するに到った。

かくして本発明によれば、

第一に、NXB（Nはアスパラギン、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸、Bはセリンまたはスレオニンである）をコードするDNA領域の少なくとも一つが、真核細胞内での発現時にN-グリコシル化が生じないように改変されている原核細胞由来のDNA分子が提供され、

第二に、当該改変されたDNA分子のN末端側にシグナル配列をコ

ードするDNAが、融合蛋白質として発現するよう連結されてなる融合DNA分子が提供され、

第三に（１）NXB（Nはアスパラギン、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸、Bはセリンまたはスレオニンである）をコードするDNA領域の少なくとも一つが、真核細胞内での発現時にN-グリコシル化が生じないように改変されているDNA分子、または（２）当該改変されたDNA分子のN末端側にシグナル配列をコードするDNAが、融合蛋白質として発現するよう連結されてなる融合DNA分子、を組み込んだ組み換えウイルスが提供され、

第四に、当該組み換えウイルスを用いて、真核細胞内で、当該改変してなるDNA分子または当該融合DNA分子によってコードされる蛋白質を製造する方法が提供され、そして

第五に、当該組み換えウイルスを用いたワクチンが提供される。

#### 図面の簡単な説明

図１は、改変されたDNAを含む組み換えウイルスから発現されたN-グリコシル化されないTTMG-1抗原（Lane 3）と改変されていないDNAを含む組み換えウイルスから発現されたN-グリコシル化されたTTMG-1抗原（Lane 2）の抗-TTMG-1抗血清により検出された分子量を比較したウエスタンブロット図である。この図において、Lane 1は抗原遺伝子を含まないウイルスからの結果（陰性Control）を示し、Lane 4は、抗-TTMG-1抗血清では検出されないMGC3抗原の結果を示す。

図２は、改変されたTTMG-1抗原をコードするDNAとシグナル配列MDVgBをコードするDNAとの融合体DNAを含むFPVウイルスから発現されたN-グリコシル化されないTTMG-1融合蛋白質（Lane 5）及び前記融合体DNAを含むHTVウイルスから発現されたN-グリコシル化さ

れないTTMG-1融合蛋白質（Lane 1 および 2）と、これに対応し改変されていないDNAを含むFPVウイルスから発現されたN-グリコシル化されたTTMG-1融合蛋白質（Lane 6）とを抗-TTMG-1抗血清により検出した分子量を比較したウエスタンブロット図である。この図において、Lane 4 は抗原遺伝子を含まないFPVからの結果（陰性Control）であり、そしてLane 3 は前記抗血清によっては検出されない抗原蛋白質NDVの結果である。

図 3 は、改変されたMGC3抗原をコードするDNAとシグナル配列MDVgBをコードするDNAとの融合体を含むFPVウイルスから発現されたN-グリコシル化されない融合蛋白質の分子量が120kdであることを示すウエスタンブロット図である。改変されていないmgc3遺伝子から発現されるN-グリコシル化されたMGC3抗原の分子量が140kdであることは別途確認されている。この図において、Lane 1 は分子量標準を示し、そしてLane 4 は抗原遺伝子を含まないウイルスからの結果を示す。

図 4 は、改変されたmgc3遺伝子が導入されたウイルスから発現されたN-グリコシル化されないMGC3抗原（分子量120kd）を糖鎖切断酵素Endoglycosidase又はPNGaseFにより処理してもその分子量が変化（減少）しないことを示すウエスタンブロット図である。

図 5 において、Aは抗原蛋白質を抗-TTMG-1（anti-40K）抗血清による免疫沈降法により検出した結果を示し、そしてBは抗原蛋白質MGC3と反応するモノクローナル抗体35A6による免疫沈降法により検出した結果を示す。パネルA及びBのいずれも、レーン1は抗原遺伝子を含まないウイルス（親FPV）からの結果を示し、レーン2はグリコシル化されたTTMG-1抗原を発現する改変されていないTTMG-1遺伝子を含むウイルスからの結果を示し、レーン3はN-グリコシル化されていないTTMG-1抗原を発現する改変されたTTMG-1遺伝

子及びN-グリコシル化されていないMGC3抗原を発現する改変されたmgc3抗原遺伝子を含むウイルスからの結果を示し、そしてレーン4はN-グリコシル化されたMGC3抗原を発現する改変されていないmgc3遺伝子を含むウイルスからの結果を示す。

#### 発明の好ましい形態

本発明において、NXB（Nはアスパラギン、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸、Bは、セリンまたはスレオニン）で表されるアミノ酸配列は、原核細胞由来のDNA分子によってコードされたペプチドの中に存在する、真核細胞においてN-グリコシレーションサイトとして認識されるアミノ酸配列である。本発明においては、このアミノ酸配列を、「潜在的なN-グリコシレーションサイト」と表現することがある。

このようなアミノ酸配列として知られているのは、N（アスパラギン）-X（Xはプロリン以外の任意のアミノ酸）-S（セリン）で表されるアミノ酸配列、またはN（アスパラギン）-X（Xはプロリン以外の任意のアミノ酸）-T（スレオニン）で表されるアミノ酸配列である。

本発明において、N-グリコシル化（N結合型糖鎖付加）されないように改変するDNA領域は、原核細胞由来の遺伝子中に存在する1以上のN-グリコシレーションサイトをコードするDNA領域である。原核細胞由来の遺伝子中に、複数のN-グリコシレーションサイトをコードするDNA領域が存在する場合、最終的に得られる蛋白質の立体構造を考慮して表面に呈示されるN-グリコシレーションサイトをコードするDNA領域だけを改変することもできるし、当該遺伝子中に存在するすべての当該領域を改変することもできる。

#### 改変されたDNA分子

本発明の改変されたDNA分子は、原核細胞由来の遺伝子中に存在する、潜在的なN-グリコシレーションサイトをコードするDNA領域のうち、少なくとも一つの領域を、真核細胞内での発現時にN-グリコシル化が生じないように改変されているDNA分子である。

(原核細胞)

本発明において原核細胞は、細菌であっても藍藻であってもよいが、本発明の目的には病原性の細菌が合致している。例えば、黄色ブドウ球菌、破傷風菌、ボツリヌス菌などのグラム陽性菌；大腸菌、サルモネラ菌、ヘモフィルス菌、ボルデテラ菌などのグラム陰性細菌；結核菌などの抗酸菌；マイコプラズマなどが挙げられ、好ましくは鳥類に対する病原性のあるマイコプラズマが挙げられる。

(改変の標的となる原核細胞由来の遺伝子)

本発明において改変の標的となる原核細胞由来の遺伝子は、上記の原核細胞が有する遺伝子の一部であって、蛋白質などの遺伝子産物をコードする遺伝子領域を含むものである。特にワクチンとして用いる場合、遺伝子は、抗原蛋白質をコードする抗原遺伝子の全部または1つ以上のエピトープを有する一部を含むものであるのが好ましい。

抗原遺伝子としては、各種細菌に存在するアドヘシンを例にあげることができ、さらに具体的には、ボルデテラ菌のPertactin、Fimbriae、Filamentous hemagglutinin(FHA)をコードする遺伝子など、マイコプラズマの、米国特許第5766594号公報で示されているTM-G-1抗原(29kd)や、米国特許第5489430号公報で示されているTTM-G-1抗原(40kd)をコードする配列番号1記載のTTM-1遺伝子、米国特許第5,871,742号公報で示されているTM-66抗原(66kd)やTM-67抗原(67kd)をコードする遺伝子、国際公開第97/24370号公報で示されるM11抗原(これは、Yoshidaらが用いたMGC3抗原と同一である)

をコードする、配列番号 2 記載のmgc3遺伝子 (GeneBank accession No. AB023292) などが例示することができる。

改変の標的となる原核細胞由来の遺伝子の塩基配列を解析し、この配列からアミノ酸配列を推定することにより、当該遺伝子中の潜在的なN-グリコシレーションサイトをコードするDNA領域を特定することができる。

また、用いる当該遺伝子中に原核細胞特有の翻訳コドンがある場合、必要に応じてこの部分を改変することもできる。例えば、マイコプラズマ由来の場合は、通常の実核細胞では終止コドンとして読みとる塩基配列「TGA」が、トリプトファンとして翻訳されるため、この「TGA」を真核細胞内でアミノ酸として翻訳されるように改変 (TGAをトリプトファンとして翻訳させる場合は、TGGに変更する) することができる。

更に、ボックスウイルスを用いて蛋白質を発現させる場合、「T5 NT」という塩基配列はTranslational Termination Signalとなる可能性があるので (Yanagidaら、1992)、アミノ酸の置換を伴わないように、改変し、翻訳の停止を防止するのが望ましい。

このほか、HIVのGP120遺伝子をヒト最適化コドンへ変換した結果、そのDNAワクチンとしての効果が増大したと報告されている (Andreら1998) とおり、DNA分子を発現させる生体で使用頻度の高いアミノ酸への翻訳コドンに置換すること (コドンの最適化) により、遺伝子の発現量を増大させることができる場合がある。そこで、例えば、本発明のDNA分子を鶏内で発現させる場合、チキンコドンへ最適化することにより遺伝子発現が増大する可能性があるため、必要に応じてチキンコドンへの改変を行うこともできる。

(N-グリコシレーションサイトを改変する方法)

原核細胞由来の遺伝子中のN-グリコシレーションサイトを改変



する方法として、例えば次の3つの改変方法が挙げられる。

(1) アスパラギン (N) をコードするDNA配列をアスパラギン以外のアミノ酸をコードするDNA配列に改変する。

(2) プロリン以外の任意のアミノ酸 (X) をコードするDNA配列を、プロリンをコードするDNA配列に改変する。

(3) セリンまたはスレオニン (B) をコードするDNA配列を、セリンおよびスレオニン以外のアミノ酸をコードするDNA配列に改変する。

これら3つの方法の中でも、特に蛋白質の立体構造に影響を及ぼさない点から、(1)の方法において、アスパラギン (N) をコードするDNA配列をグルタミン (Q) をコードするDNA配列に変更するのが好ましい。

こうした遺伝子の改変方法は、格別制限されない。例えば、合成DNAを用いたin vitro mutagenesisやPCR(Polymerase Chain Reaction)を用いた方法などが一般的に行われている。複数の変異を導入しやすい、かつ早くできるという点から、PCRを用いた方法が好ましい。

#### 融合DNA分子

本発明の融合DNA分子は、上述した本発明のDNA分子のN末端側に、融合蛋白質として発現するようにシグナル配列をコードするDNAを連結したものである。

本発明のDNA分子のN末端側に、シグナル配列をコードするDNAを連結させ融合蛋白質を発現させることは、より高い免疫原性を持つワクチンを得ることを可能にする。

(シグナル配列とそれをコードするDNA)

シグナル配列や、これをコードするDNAを他のDNA分子に連結する方法などは、米国特許第5871742号、国際公開W097/36924号、およ

びYoshidaら（2000）に詳述されているが、以下に簡単に説明する。

シグナル配列は、ウイルスなどの膜蛋白質を膜外に分泌または呈示させる際に機能する配列である。シグナル配列の由来となる膜蛋白質はタイプIでもタイプIIでもどちらでも良い。膜蛋白質としては、ニューカッスル病ウイルス（NDV）のヘマグルチニンノイラミニダーゼ（HN）蛋白質、単純ヘルペスウイルス（HSV）1型ウイルスやマレックウイルス（MDV）1型ウイルスのgB蛋白質、狂犬病ウイルスG糖蛋白質などが例示される。シグナル配列は、膜蛋白質のアミノ末端もしくはカルボキシ末端の疎水性ペプチド領域のアミノ酸配列を解析することにより、容易に見いだすことが可能である。

こうして特定されたシグナル配列をコードするDNAを常法により取得し、本発明のDNA分子と連結させ、本発明の融合DNA分子を得る。このとき、融合蛋白質として発現させるために、DNA分子の塩基配列を分析して推定されるオープン・リーディング・フレーム（ORF）のフレームにあわせるようにして、DNA分子のN末端側にシグナル配列を常法に従って連結する。

こうしたシグナル配列中に、潜在的なN-グリコシレーションサイトが存在する場合、シグナル配列をコードするDNAも、本発明のDNA分子と同じく、真核細胞内で発現したときに、N-グリコシレーションサイトとして認識されないように、上述と同様に改変するのが好ましい。

### 組み換えウイルス

本発明の組み換えウイルスは、本発明のDNA分子や融合DNA分子（以下、両者をまとめて本発明の「DNA分子」と言うことがある）が、そのゲノム中に組み込まれたものである。

組み換えウイルスに本発明のDNA分子を組み込む場合、高い発現

量を得るため、通常、制御遺伝子（プロモーター）の制御下に、本発明のDNA分子が配置されるように組み込む。プロモーターは、真核細胞で機能する一般的なものでよく、真核細胞由来でもウイルス由来のものでも構わない。プロモーターの具体的な例としては、ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーター（Rossら1993）、七面鳥ヘルペスウイルス（HVT）およびマレックウイルス（MDV）1型のgB蛋白質プロモーター（Rossら1993）、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）のI Eプロモーター（Stinskiら1995）、SV40プロモーター（Gunningら1987）、ヒト $\beta$ アクチンプロモーター（Gunningら1987）、ニワトリ $\beta$ アクチンプロモーター（Kostら1983）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）のL T Rプロモーター（Greuelら1990）、キメラプロモーター（日本特許公開2001-188号公報）などが例示される。

プロモーターに加えて、転写を活性化する因子であるエンハンサーを加えることにより、さらに効率的な発現が予想される（Stinskiら1995）。エンハンサーは、サイトメガロウイルス由来プロモーターの一部などが例示され、挿入遺伝子との位置的關係は通常限定されない。

このほか、更に、本発明のDNA分子の下流に、ポリアデニレーションシグナルをコードするDNAを付加すると、組み換えヘルペスウイルスの場合、特に高い発現量が得られる。ポリアデニレーションシグナルとしては、SV40などのPolyAシグナル（Gunningら1987）やマレックウイルス（MDV）1型のUL46h、UL47h、UL49hのPolyAシグナル（Yanagidaら1993）が例示される。

本発明の組み換えウイルスを得る方法に格別な制限はなく、例えば、本発明のDNA分子やプロモーターなど任意のDNA（以下、ウイルスに挿入するDNAを総称して外来遺伝子ということがある）を組み

込みたいウイルスの増殖に非必須な遺伝子領域断片でサンドイッチさせたベクターと、ウイルスゲノムとを相同組み換えさせるなどの手法が挙げられる。

組み換えヘルペスウイルスと組み換えボックスウイルスを例に本発明の組み換えウイルスを、以下に詳述する。

(組み換えヘルペスウイルス)

ヘルペスウイルスの増殖に非必須な遺伝子領域は、例えばマレックウイルス (MDV) 1 型、2 型、および 3 型 (3 型は七面鳥ヘルペスウイルスである) を例にとると、TK領域 (Ross L. ら、1991)、U S10領域 (Sakaguchi M. ら1994)、US2領域 (Sondermeijer, P. J. ら1993)、国際公開第W099/18215号公報に記載のUL44と45の間の領域やUL45と46の間の領域 (配列番号3は、UL44～46までの配列) を例示することができる。

本発明のDNAやプロモーターなど必要な外来遺伝子を、この非必須領域でサンドイッチしたDNA領域を持つ組み換えベクターを構築する。本発明のDNA分子などの外来遺伝子を挿入する領域の長さは特に限定されないが、外来遺伝子挿入部位の前後10bpあればよく、好ましくは100bp以上、より好ましくは500bp以上あればよい。ベクターは一般に組み換えウイルス作製に用いられるものでよく、例えば、pBR322、pBR325、pBR327、pBR328、pUC8、pUC18、pUC19などのプラスミド、 $\lambda$ ファージ、M13ファージなどのファージ、pHC9などのコスミドが例示される。

この組み換えベクターと親ウイルスとなるヘルペスウイルスとの間に相同組み換えを起こさせて組み換えヘルペスウイルスを作製する。

親ウイルスであるヘルペスウイルスは、ほ乳類や鳥類に感染するいかなるヘルペスウイルスでもよい。鳥類用ワクチンを得る場合、

マレックウイルスを選択するのが望ましい。マレックウイルスは、1、2および3型の3種類があるが、本発明の組み換えヘルペスウイルスを得るためにはどの型のものを選択しても良い。これらのマレックウイルスは、天然に得ることができるほか、ATCCなどから有償または無償で入手できるものが挙げられ、特に非病原性のものが好ましい。このようなウイルスとしては、例えば、マレックウイルス1型であれば、CVI988 (Rispons) 株など、マレックウイルス2型であればSB-1株など、マレックウイルス3型 (HVT) であれば、F C126 (ATCC VR-584B)、PB-THV1、H-2、YT-7、およびHPRS-26などが例示できる。

組み換えヘルペスウイルスを作製する具体的な方法としては、以下に説明する方法が挙げられる。

上述した外来遺伝子を非必須な挿入部位でサンドイッチした組み換えベクターをヘルペスウイルス感染細胞に、エレクトロポレーションやリン酸カルシウム法、リポフェクチンを用いた方法や遺伝子銃などで導入する。たとえば鳥類ヘルペスウイルスの場合、ヘルペスウイルスを感染させる細胞は、鳥類由来の細胞が望ましく、たとえばCEF (ニワトリ胚繊維芽細胞)、発育鶏卵、鶏腎臓細胞などが挙げられる。感染細胞の培養は、通常行われる培養法でよい。組み換えベクターを感染細胞に導入する方法は、高い導入効率が得られる点から、エレクトロポレーションやリポフェクチンを用いた方法を採用することが望ましい。導入するプラスミドの量を0.1~1000  $\mu$ gの範囲とすると、ヘルペスウイルスのゲノムDNAと組み換えベクターの相同領域との間での組み換えウイルスの発生率が高くなる。このようなプラスミドを導入した組み換えウイルスのみを選択するためには、BPA(Black Plaque Assay) 法を用いることができる。BPA法とは、外来遺伝子産物と、これに対する抗体とを反応させ、

次に酵素標識をした二次抗体を用いて反応させた後、当該酵素に対応する基質を用いて外来遺伝子産物を発現したプラークを可視化する方法である。この方法により、外来抗原遺伝子を発現した組み換えウイルスを選択する。また、これら組み換えウイルスを作製する場合、検出が容易であるという利点があるため、外来遺伝子のひとつとして $\beta$ -ガラクトシダーゼなどのマーカー遺伝子を組み込むこともでき、この場合Bluo-Gal(Gibco BRL社製)を用いて簡単に発現をモニターして組み換え体を単離する。その他、プラークハイブリダイゼーションなどの方法により目的とする組み換えヘルペスウイルスを単離することもできる。これら操作を繰り返すことによって、組み換えウイルスを純化する。

#### (組み換えボックスウイルス)

組み換えボックスウイルスの作製は、組み換えヘルペスウイルス作製の場合と同様に、相同組み換えを利用して、組み換えボックスウイルスを作製すればよい。

但し、ボックスウイルスは、転写因子などをウイルス自体で持っており、そのウイルス自体の構成物によって転写、翻訳が行われると考えられている。そのため、用いられるプロモーターは上述した組み換えヘルペスウイルスの作製に使用可能なプロモーターとして例示されたものではなく、ボックスウイルス用のプロモーターへの変更が必要である。このボックスウイルス用のプロモーターとしては、Davisonらの文献1および2(1989)を参考にして、ボックスウイルスに属するウイルス内でプロモーターとして機能する合成プロモーターを使用することもできるし、ボックスウイルスの天然のプロモーターを使用することもできる。ボックスウイルスの天然のプロモーターとしては、ワクシニアウイルスの7.5Kプロモーター、19Kポリペプチドプロモーター、42Kポリペプチドプロモーター、28

Kポリペプチドプロモーター、およびTKプロモーターなど（Weirら1984）が例示できる。

また、組み換えポックスウイルスを用いて蛋白質を発現させる場合、上述したとおり、外来遺伝子は、T5NT領域を改変したものを用いるのが好ましい。

ポックスウイルスの増殖に非必須な遺伝子領域としては、例えばアビポックスウイルス科に属するウイルスであるファウルポックスウイルス、ピジョンポックス、ウェイルポックス、七面鳥ポックスウイルスなどのTK遺伝子領域や米国特許第5180675号公報や日本特許第2766984号公報で示されているオープン・リーディング・フレーム（ORF）間領域、米国特許5387519に記載されている領域を使用することができる。さらに具体的には、米国特許第5387519号公報に記載されているピジョンポックス由来のEcoRI断片（7.3Kbp）、EcoRI-HindIII断片（約5.0Kbp）、BamHI断片（約4.0Kbp）、HindIII断片（約5.2Kbp）、および米国特許第5387519号公報に記載のEcoRI断片（7.3Kbp）中のSpeI-HpaI(3026bp)（配列番号4）などを例示することができる。

### 蛋白質の製造

本発明の組み換えウイルスを、当該ウイルスが生存し、増殖可能な細胞に感染させ、細胞を培養することにより、組み換えウイルスに組み込まれた原核細胞由来のDNA分子が発現され、当該DNA分子によってコードされた蛋白質が得られる。

ウイルスを感染させる細胞は、上述した組み換えウイルスを作製する際に用いた細胞と同じものが使用できる。培養条件等も同様である。

得られた蛋白質を精製する方法に格別な制限はないが、例えばmethods in Enzymology, Vol.182（「Guide to Protein Purification

」Murry P. Desutscher編、Academic Press社発行）の記載に準じて単離・精製すればよい。

このようにして得られた抗原ポリペプチドは、常法により希釈し、あるいは適当なアジュバントなどと混合し、コンポーネントワクチンとして用いることができる。用いるアジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、アラム、アラセルなどが例示される。アジュバントとの混合比は特に限定されないが、通常1：1である。コンポーネントワクチンとして用いる場合、例えばニワトリでは通常一個体当たり0.1 $\mu$ g以上を投与すればよく、急性毒性を示さない限り、上限は特にない。投与方法は、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内注射等の方法のほか、噴霧によって気道に免疫する方法、飲水による投与などが可能である。

#### ワクチン

（組み換えヘルペスウイルスワクチン）

組み換えヘルペスウイルスを主成分とする生ワクチンの調製方法に格別な制限はない。例えば以下の方法により調整することができる。

本発明の組み換えヘルペスウイルスの感染細胞を当該ウイルスが生育できる細胞（以下、宿主細胞という）に感染させ、増殖させた後、細胞をスクレーパーまたはトリプシンではがし、遠心分離によって感染細胞と上清とに分離する。たとえば鳥類ヘルペスウイルスの場合、宿主細胞としては、トリ由来の細胞が好ましく、CEF、鶏腎臓細胞などを好適に使用することができる。得られた感染細胞は、10%のジメチルスルフォキシド（DMSO）を含む培養用培地に懸濁し、液体窒素存在下で凍結保存する。ワクチンとして使用する時は、100倍量のリン酸緩衝液や生理食塩水などにこの凍結保存品を溶かして使用する。



液体窒素下で上記感染細胞を保存するための安定剤やその他の成分は、ウイルス感染細胞が安定的に生存でき、かつレシピエントにとって薬理学的に問題のない成分であれば特に限定されない。

このようにして作製した組み換えヘルペスウイルスを主成分とする生ワクチンの家禽への投与方法は特に限定されない。例えば、ニワトリ個体の皮下に注射する方法や、発育鶏卵内で発生中に卵に穴をあけて接種する方法など、現行のヘルペスウイルスワクチンと同じ方法が挙げられる。

接種量や接種時期も従来ワクチンと同様でよい。例えば、一例として、孵化当日のニワトリの背部皮下に $10^2 \sim 10^4$  PFUまたは $10^2 \sim 10^4$  TCID<sub>50</sub>を26Gの針を用いて接種することにより、ワクチンとしての効果が期待される。ワクチン上記のようにして作製した組み換えヘルペスウイルスは、本発明のDNA分子の由来となった病原原核細胞ばかりでなく、親ウイルスとなったヘルペスウイルスに対するワクチンとしても機能する。

#### (組み換えボックスウイルスワクチン)

組み換えボックスウイルスは前記の組み換えヘルペスウイルス他の場合と全く同じで、同様の手法を用いてワクチンとして調製することができる。ただし、組み換えヘルペスウイルスの例としてあげているマレックウイルス1～3型とは異なり、感染細胞を10%のジメチルスルホキシド (DMSO) を含む培養用培地に懸濁し液体窒素存在下で凍結保存する必要はなく、感染細胞を回収して破碎し遠心分離等によって組み換えボックスウイルスを含んだ上清を得ることができる。この上清は、通常凍結乾燥して保存され、適宜、薬学的に許容されるキャリアーや生理食塩水などと混合しワクチンとして用いるが、凍結乾燥せず、キャリアーや生理食塩水などを添加し、ワクチンとして用いることも可能である。

組み換えポックスウイルスワクチンの接種法、接種量や接種時期も従来ワクチンと同様でよい。例えば、組み換えアビポックスウイルスワクチンの場合、孵化1週間程度のニワトリの翼膜に $10^2 \sim 10^4$  PFUまたは $10^2 \sim 10^4$  TCID<sub>50</sub>を、穿刺針を用いて接種する。

このようにして作製した組み換えポックスウイルスは、本発明のDNA分子の由来となった病原原核細胞に対するだけでなく、親ウイルスとなったポックスウイルスに対するワクチンとしても機能する。

更に、本発明の組み換えウイルスを作製するときに、構築された組み換えベクターは、そのまま、DNAワクチンとしての使用が可能である。これは、精製したベクターを直接、真核細胞個体に接種することにより、抗原を発現させる手法である。単独またはDNAの発現や免疫能を補助するものと共に注射、ひっかき傷をつくって接種したり、遺伝子銃等により、真核細胞個体に導入することによってワクチンとして用いることができる。

真核細胞細胞で増殖するベクターを用いた場合、そのまま真核細胞、たとえば株化された培養細胞や初代培養細胞などに、エレクトロポレーションやリン酸カルシウム法、リポフェクチンを用いた方法や遺伝子銃などで導入して、一時的または細胞染色体に組み込まれることによって継続的に、当該遺伝子が発現した細胞を得ることができる。この発現した細胞をそのまま、または精製することによって、コンポーネントワクチンとして用いることも可能である。

## 実施例

以下に、実施例を挙げて本発明を説明する。

### [遺伝子改変の原則]

本発明において、真核細胞で発現させようとする遺伝子の潜在的

なN-グリコシレーションサイトを除去する時には、特に断りのない限り、以下のA～Cの原則を適用した。

#### A. N-グリコシレーションサイトの除去

潜在的N-グリコシレーションサイトである、Asn(N)-X-Ser(S)またはAsn(N)-X-Thr(T) (Xはプロリン以外のアミノ酸) に対応する塩基配列は、Asn(N)をコードするDNA配列を、Gln(Q)をコードするDNA配列に改変した。

#### B. ORF開始コドン付近の最適化

ORF開始コドンATGの5'側にある3塩基をAAAに改変し、開始コドンATGとその上流にある3塩基とからなる計6塩基の配列を、AAAATGとした。このような改変であれば、コサックのルールとPOXのルールに不都合は生じない。

#### C. T5NTの除去

ボックスウイルスで発現させる場合、Translational Termination codonとなる可能性があるT5NTについて、アミノ酸の置換を伴わないように、この領域の塩基配列を改変し翻訳の停止を防止した。

#### D. チキンコドンへの最適化

更に、必要に応じてチキンコドンへの最適化を行った。Nakamuraらの文献(1996)に基づいて基本的には最も使用頻度の高いコドンを選択し、そのコドンになるように塩基配列を改変した。

#### 参考例 1. MDVgBシグナルの改変

配列番号5記載のマレックウイルスgB蛋白質の、186bp(62アミノ酸)のシグナル配列中に存在する2つのN-グリコシレーションサイトに対応するDNA配列を、上記改変の原則Aに基づいて改変し、配列番号6のアミノ酸配列をコードするDNAを得た。

このDNAを、更に、上記改変の原則BおよびCに基づいて改変し、配列番号7記載の塩基配列の改変されたMDVgBシグナルDNAを得た

この改変されたMDVgBシグナルDNAをプラスミドPCR-II (Invitrogen社) にクローニングし、プラスミドPCR2-MDgB-CGを構築した。当該プラスミド中の改変されたMDVgBシグナルDNAの5'側にBamHI、3'側にEcoRIサイトがある。

#### 参考例 2. Ravies gGシグナルの改変

N-グリコシレーションサイトが存在しない配列番号8記載のRavies Virus gGシグナル(23アミノ酸)をコードするDNAを、上記改変の原則B~Dに則って改変し、配列番号11に示す改変されたRavies gGシグナルDNAを有するプラスミドpUC-rgGを得た。

このプラスミドを得る具体的な手法は、以下の通りである。

即ち、配列番号9および10記載の2本の合成DNAをアニールの後、pUC18のBamHI-EcoRI切断2665bp断片に挿入して、pUC-rgGを構築した。

#### 実施例 1. MG遺伝子TTM-1遺伝子の改変

##### (1) pGTPs40KS-Nglyの構築

マイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原遺伝子TTM-1のN端にMDVgBシグナルをコードするDNAが連結された、国際公開第W097/36924号公報に記載のプラスミドpNZ40K-Sの、配列番号12記載のアミノ酸配列を有するTTM-1部分には、4カ所のN-グリコシレーションサイトが存在する。TTM-1部分の始まりであるEcoRIサイトから83bp下流のBglIIサイトまでの間には、N-グリコシレーションサイトが存在しないので、BglIIから下流の部分について、上記改変の原則Aに則った改変を行い、TTM-1のBglIIサイトより下流の配列が、配列番号23に示すアミノ酸配列に対応する、配列番号24記載の塩基配列を持つ改変TTM-1遺伝子を有するプラスミドpGTPs40KS-Nglyを得た。このプラスミドを得る具体的な手法は、以下の通りで

ある。

合成DNAをプライマーとして用いて、PCRによって変異を行った。PCRは、Pfu Polymerase (Promega)を用いて、PerkinElmer社のDNA Thermal Cycler480を用いて、通常の条件でおこなった。25～30サイクルを行い、アニール温度を60℃から47℃の範囲で、最適条件を決めて行った。

PCRのテンプレートとしては、W097/36924記載のTTM-1とMDgBシグナルを有するpGTPs40K-Sを用いた。

最初に、プライマー40KG-1（配列番号13）とプライマー40KG-2R（配列番号14）でPCRを行い、136bpの断片を得た。

同様に、プライマー40KG-2（配列番号15）とプライマー40KG-3R（配列番号16）でPCRを行い、341bpの断片を得た。

同様に、プライマー40KG-3A（配列番号17）とプライマー40KG-4RA（配列番号18）でPCRを行い、190bpの断片を得た。

同様に、プライマー40KG-4（配列番号19）とプライマー40KG-5R（配列番号20）でPCRを行い、359bpの断片を得た。

同様に、プライマー40KG-5（配列番号21）とプライマー40KG-6R（配列番号22）でPCRを行い、218bpの断片を得た。

次に行ったPCRは、プライマー40KG-1と40KG-2RのPCR産物136bpとプライマー40KG-2と40KG-3RのPCR産物341bpとプライマー40KG-3Aと40KG-4RAのPCR産物190bpの3つの断片をテンプレートとして、上記の条件でプライマー40KG-1（配列番号13）とプライマー40KG-4RA（配列番号18）でPCRを行い、595bpの断片を得た。

同様に、プライマー40KG-4と40KG-5RのPCR産物359bpとプライマー40KG-5と40KG-6RのPCR産物218bpをテンプレートとして、上記の条件でプライマー40KG-4（配列番号19）とプライマー40KG-6R（配列番号22）でPCRを行い、539bpの断片を得た。

さらに上記のプライマー40KG-1と40KG-4RAのPCR産物595bpと、プライマー40KG-4と40KG-6RのPCR産物539bpをテンプレートとして、上記の条件でプライマー40KG-1（配列番号13）とプライマー40KG-6R（配列番号22）でPCRを行い、改変されたTTM-1の部分断片（1088bp）を得た。

この1088bpの断片をBglIIIとSalIで切断して得られた断片と、W097/36924記載のpGTPs40K-SをBglIIIとSalIとで切断して得られた2896bpとをライゲーションして、N-グリコシレーションサイトをコードするDNA領域を改変した改変TMM-1遺伝子を有するプラスミドpGTPs40KS-Nglyを構築した。

#### 実施例 2. MG由来のmgc3遺伝子の改変

配列番号2記載のmgc3遺伝子（GeneBank accession No. AB023292）がコードする、配列番号25記載のアミノ酸配列には、16カ所のN-グリコシレーションサイトがある。この16カ所のサイトのうち、一番5'上流側に存在するサイトは、後の処理でシグナル配列に置換されるため、改変対象から外し、残りの15カ所について、改変の原則Aに則り、塩基配列を改変し、配列番号78に示すアミノ酸配列に対応する、配列番号79記載の塩基配列を持つmgc3遺伝子を有するプラスミドpM11BTRを得た。

このプラスミドを得る具体的な手法は、以下の通りである。

改変には、合成DNAをプライマーとして用いて、PCRによって変異を行った。

また、mgc3遺伝子は約3KBと長いため、約1kbの断片3つに分け、それぞれ1094bpのBKR領域、908bpのKXR領域、1192bpのXGTRと名づけた。これら3つの断片について、それぞれ変異を行い、塩基配列を確認後、つなぎ合わせた。

PCRは、実施例1と同様にPfu Polymerase (Promega)を用いて、

通常の条件でおこなった。25～30サイクルを行い、アニール温度を60℃から47℃の範囲で、最適条件を決めて行った。尚、最初の改変のためのテンプレートには、Yoshidaら（2000）記載のMycoplasma gallisepticum由来のmgc3遺伝子をpUC18に挿入したpUC-MGC3を用いた。

#### （１）BKR領域の変異（pM11BKRの構築）

pUC-MGC3をテンプレートにして、プライマーM11-B（配列番号26）とプライマーM11-2R（配列番号27）でPCRを行い、136bpの断片を得た。

pUC-MGC3をテンプレートにして、プライマーM11-2（配列番号28）とプライマーM11-3R（配列番号29）でPCRを行い、92bpの断片を得た。

pUC-MGC3をテンプレートにして、プライマーM11-3（配列番号30）とプライマーM11-4RB（配列番号31）でPCRを行い、271bpの断片を得た。

pUC-MGC3をテンプレートにして、プライマーM11-4B（配列番号32）とプライマーM11-5R（配列番号33）でPCRを行い、116bpの断片を得た。

pUC-MGC3をテンプレートにして、プライマーM11-5A（配列番号34）とプライマーM11-7RA（配列番号35）でPCRを行い、439bpの断片を得た。

pUC-MGC3をテンプレートにして、プライマーM11-7（配列番号36）とプライマーM11-KR（配列番号37）でPCRを行い、201bpの断片を得た。

次に行ったPCRは、プライマーM11-BとプライマーM11-2RのPCR産物136bpとプライマーM11-2とプライマーM11-3RのPCR産物92bpをテンプレートとして、プライマーをM11-B（配列番号26）とM11-3R（

配列番号29) でPCRを行い、199bpの断片を得た。

同様に、プライマーM11-3とプライマーM11-4RBのPCR産物271bpとプライマーM11-4BとプライマーM11-5RBのPCR産物133bpをテンプレートとして、プライマーをM11-3 (配列番号30) とM11-5R (配列番号33) でPCRを行い、344bpの断片を得た。

同様に、プライマーM11-5 AとプライマーM11 -7RAのPCR産物439bpとプライマーM11-7とプライマーM11-KRのPCR産物201bpをテンプレートとして、プライマーをM11-5A (配列番号34) とプライマーM11-KR (配列番号37) でPCRを行い、610bpの断片を得た。

これら3つのPCR産物、プライマーM11-BとM11-3RのPCR産物 (199bp)、プライマーM11-3とM11-5RB3RのPCR産物 (361bp)、プライマーM11-5AとM11-KRのPCR産物 (610bp) をテンプレートとして、プライマーをM11-B (配列番号26) とM11- KR (配列番号37) でPCRを行い、1094bpの断片を得た。このプライマーM11-BとM11-KRのPCR産物 (1094bp) をEcoRIとKpnIで切断した1070bpの断片を、EcoRIとKpnIで切断したプラスミドpUC18の2678bp断片に挿入することによって、pM11BKRを構築した。

このpM11BKRの塩基配列を解析したところ、GeneBankに登録されているmgc3遺伝子 (GeneBank accession No. AB023292) と異なる配列があった。さらに元のプラスミドであるpUC-MGC3の配列を比較して、PCRのエラーでないことを確認した。その結果、GeneBankに登録された配列である配列番号2における308番目のGはTであり、311番目のGはCであり、561番目のCはGであり、749番目のGはTであることことを確認した。561番目の塩基のエラーにより、この領域でコードされたアミノ酸配列は、N-グリコシレーションサイトに相当するN-Asn(N)-Gln(Q)-Thr(T)ではなく、Gln(Q)-Gln(Q)-Thr(T)であることが判明した。



## (2) KXR領域の変異 (pM11KXRの構築)

pUC-MGC3をテンプレートとして、プライマーM11-K (配列番号38) とプライマーM11-8R (配列番号39) でPCRを行い、151bpの断片を得た。

pUC-MGC3をテンプレートとして、プライマーM11-8 (配列番号40) とプライマーM11-10R (配列番号41) でPCRを行い、109bpの断片を得た。

pUC-MGC3をテンプレートとして、プライマーM11-10 (配列番号42) とプライマーM11-12RA (配列番号43) でPCRを行い、416bpの断片を得た。

pUC-MGC3をテンプレートとして、プライマーM11-12A (配列番号44) とプライマーM11-XR (配列番号45) でPCRを行い、350bpの断片を得た。

次に行ったPCRは、プライマーM11-8とプライマーM11-10RのPCR産物109bpと、プライマーM11-10とプライマーM11-12RAのPCR産物416bpをテンプレートとして、プライマーをM11-8 (配列番号40) とM11-12RA (配列番号43) でPCRを行い、487bpの断片を得た。

さらに、プライマーM11-KとプライマーM11-8RのPCR産物151bpと、プライマーM11-8とプライマーM11-12RAのPCR産物487bpをテンプレートとして、プライマーをM11-K (配列番号38) とプライマーM11-12RA (配列番号43) でPCRを行い、596bpの断片を得た。

上記2つのPCR産物、プライマーM11-KとプライマーM11-12RAのPCR産物596bpと、プライマーM11-12AとプライマーM11-XRのPCR産物350bpをテンプレートとして、プライマーをM11-K (配列番号38) とプライマーM11-XR (配列番号45) でPCRを行い、908bpの断片を得た。

このプライマーM11-KとプライマーM11-XRのPCR産物 (908bp) をKpnIとXbaIで切断した885bpの断片を、KpnIとXbaIで切断したプラス

ミドpUC18に挿入することによって、pM11KXRを構築した。

このpM11KXRの塩基配列を解析したところ、GeneBank に登録されているmgc3遺伝子 (GeneBank accession No. AB023292) と異なる配列があった。さらに元のプラスミドであるpUC-MGC3の配列を比較して、PCRのエラーでないことを確認した。その結果、GeneBankに登録された配列である配列番号2における1279番目のGはAであり、1729番目のTはGであり、1732番目のCはGであることを確認した。

### (3) XGTR領域の変異 (pM11XGTRの構築)

pUC-MGC3をテンプレートとして、プライマーM11-XA (配列番号46) とプライマーM11-13RA (配列番号47) でPCRを行い、238bpの断片を得た。

pUC-MGC3をテンプレートとして、プライマーM11-13A (配列番号48) とプライマーM11-14RA (配列番号49) でPCRを行い、266bpの断片を得た。

pUC-MGC3をテンプレートとして、プライマーM11-14A (配列番号50) とプライマーM11-15RA (配列番号51) でPCRを行い、168bpの断片を得た。

pUC-MGC3をテンプレートとして、プライマーM11-15A (配列番号52) とプライマーM11-16RA (配列番号53) でPCRを行い、123bpの断片を得た。

pUC-MGC3をテンプレートとして、プライマーM11-16A (配列番号54) とプライマーM11-GTR (配列番号55) でPCRを行い、556bpの断片を得た。

次に行ったPCRは、プライマーM11-XAとプライマーM11-13RAのPCR産物238bpと、プライマーM11-13AとプライマーM11-14RA のPCR産物266bpをテンプレートとして、プライマーをM11-XA (配列番号46)

とプライマーM11-14RA（配列番号49）でPCRを行い、463bpの断片を得た。

さらに、プライマーM11-14AとプライマーM11-15RAのPCR産物168bpと、プライマーM11-15AとプライマーM11-16RAのPCR産物123bpをテンプレートとして、プライマーをM11-14A（配列番号50）とプライマーM11-16RA（配列番号53）でPCRを行い、253bpの断片を得た。

さらに、上記3つのPCR産物、プライマーM11-XAとプライマーM11-14RAのPCR産物463bp、プライマーM11-14AとプライマーM11-16RAのPCR産物253bp、プライマーM11-16AとプライマーM11-GTRのPCR産物556bpをテンプレートとして、プライマーをM11-XA（配列番号46）とプライマーM11-GTR（配列番号55）でPCRを行い、1192bpの断片を得た。

このプライマーM11XAとプライマーM11-GTRのPCR産物（1192bp）をXbaIとSalIで切断した1174bpを、XbaIとSalIで切断したプラスミドpUC18の2680bp断片に挿入することによって、pM11XGTRを構築した。

このpM11XGTRの塩基配列を解析したところ、GeneBankに登録されているmgc3遺伝子（GeneBank accession No. AB023292）と異なる配列があった。さらに元のプラスミドであるpUC-MGC3の配列を比較して、PCRのエラーでないことを確認した。その結果、GeneBankに登録された配列である配列番号2における3113番目のGはCであることを確認した。

#### （4）糖鎖除去mgc3全長含有プラスミドpM11BTRの構築

pM11BKRをKpnIとSalIで切断した3723bp断片に、pM11KXRをKpnIとXbaIで切断した885bp断片とpM11XGTRのXbaIとSalIで切断した1174bp断片をライゲーションすることにより、N-グリコシレーションサイトをコードするDNA領域が改変された改変mgc3遺伝子を有するp

M11BTRを構築した。

### 実施例 3. 組み換え鶏痘用ベクターの構築

#### (1) pUCSfi-H-Sの構築

pUC18の制限酵素サイトを改変した、国際公開第W099/18215号公報に記載のpUC18XGをHindIIIとSalIで切断して得た2676bpの断片と、5'末端をリン酸化したリンカーH'-S-H-S-P-S1（配列番号56）とリンカーH'-S-H-S-P-S2（配列番号57）とをアニールした産物とをライゲーションし、pUCSfi-H-Sを構築した。

#### (2) pGHPsの構築

このpUCSfi-H-SをHindIIIとEcoRIで切断して得た2661bpの断片と、5'末端をリン酸化したリンカーS-B-E1（配列番号58）とリンカーS-B-E2（配列番号59）をアニールした産物と、ボックスの後期（レート）および前期（アーリー）プロモーターを含む国際公開第W097/36924号公報に記載のプラスミドpGTPsをHindIIIとSalIで切断して得た137pの3断片とをライゲーションして、プラスミドpGHPsを構築した。

#### (3) pGTPs40KS(CG1) の構築

参考例1で得た改変されたMDVgBシグナルDNAを有するプラスミドPCR2-MDgB-CGをBamHIとEcoRIで切断し、189bpの断片を回収した。

国際公開第W097/36924号公報記載のMDVgBシグナルDNAとTTM-1遺伝子を有するpGTPs40K-SをBamHIとEcoT22Iで切断し、3402bpのDNA断片を回収した。同じくpGTPs-40K-SをEcoRIとEcoT22Iで切断し、557bpのDNA断片を回収した。こうして得られた3つの断片をライゲーションして、プラスミドpGTPs40KS(CG1) を構築した。

#### (4) pGTPs40K-G-CSの構築

実施例1で得られた改変TTM-1遺伝子を有するプラスミドpGTPs40K-NglyをBglIIIとSalIで切断して得た3067bp断片と、上記(3)で

得たpGTPs40KS(CG1)をBglIIとSalIで切断して得た1082bp断片とをライゲーションして、プラスミドpGTPs40K-G-CSを構築した。

#### (5) pNZ1829R/40K-G-CSの構築

FPVの相同組み換え用配列とボックスのレートプロモーターとアーリープロモーターとマーカー遺伝子であるlacZ遺伝子とを含む、W097/36924に記載のプラスミドpNZ1829RをBamHIとSalIで切断して得た9217bp断片と、上記(4)で得たpGTPs40K-G-CSのBamHIとSalIで切断して得た1347bpの断片とをライゲーションし、改変されたMDVgBシグナルDNAがインフレームで接続された改変されたTTM-1遺伝子とマーカー遺伝子としてlacZ遺伝子をもつ、プラスミドpNZ1829R/40K-G-CSを構築した。

#### (6) pNZ1829R/40K-G-CS(d1-lacZ)の構築

このプラスミドpNZ1829R/40K-G-CSをSmaIおよびSfiIで切断して得た7013bpを、T4Polymerase処理し、ブランディングした後、得られた断片をセルフライゲーションして、プラスミドpNZ1829R/40K-G-CSからlacZ遺伝子を欠失させたプラスミドpNZ1829R/40K-G-CS(d1-lacZ)を構築した。シーケンスを行って、ブランディング処理部分の塩基配列を確認した。

### 実施例 4. 組み換え鶏痘用ベクターの構築

#### (1) pGHPs40KCS-Gの構築

実施例 3 (4) で構築したpGTPs40K-G-CSをBamHIとSalIとで切断して得られた1344bpの断片と、実施例 3 (2) で構築したpGHPsをBamHIとSalIとで切断して得られた2790bpの断片とをライゲーションし、pGHPs40KCS-Gを構築した。

#### (2) pNZ29RMG40KM11CS-Gの構築

実施例 2 (4) で構築した改変mgc3遺伝子を有するpM11BTRをEcoRIとSalIとで切断して得られた3129bpの断片と、上記(1)で得ら

れたpGHPs40KCS-GをEcoRIとSfiIとで切断して得られた297bpの断片と、実施例3(5)で構築したpNZ1829R/40K-G-CSをSfiIとSalIとで切断して得た6985bpの断片とを、ライゲーションして、改変されたMDVgBシグナルDNAと改変TTM-1遺伝子と改変mgc3遺伝子を有するプラスミドpNZ29RMG40KM11CS-Gを構築した。

#### 実施例5. 組み換え鶏痘用ベクターpNZ29RMG40KM11CS-G2の構築

実施例4において、構築されたpNZ29RMG40KM11CS-G中には改変mgc3遺伝子が挿入されている。この遺伝子の本来はN-グリコシレーションサイトではない箇所(配列番号2記載の第561番目の塩基に相当する)を、本来の塩基であるGに戻すため、この部分を更に改変し、再改変mgc3遺伝子を有するプラスミドpNZ29RMG40KM11CS-G2を得た。

改変mgc3を再改変した具体的手順は以下の通りである。

実施例4(2)で構築したpNZ29RMG40KM11CS-Gをテンプレートとして、実施例1記載の条件でプライマーM11-Sfi(配列番号60)とプライマーM11-5RB(配列番号61)でPCRを行い、836bpの断片を得た。

実施例4(2)で構築したpNZ29RMG40KM11CS-Gをテンプレートとして、同様の条件でプライマーM11-5C(配列番号62)とプライマーM11-KRA(配列番号63)でPCRを行い、618bpの断片を得た。

この2つのPCR産物をテンプレートとして、同様の条件でプライマーM11-Sfi(配列番号60)とプライマーM11-KRA(配列番号63)でPCRを行い、1400bpの断片を得た。この1400bpのPCR産物をSfiIとKpnIで切断して得た1368bpの断片と、実施例4(2)で構築したpNZ29RMG40KM11CS-GをSfiIとKpnIとで切断して得た9032bpの断片とライゲーションをし、改変されたMDVgBシグナルDNAと改変TTM-1遺伝子と再改変mgc3遺伝子を有するプラスミドpNZ29RMG40KM11CS-G2を構

築した。

改変部分については、シーケンスにより塩基配列を確認した。

#### 実施例 6. 組み換えHVT用ベクターの構築

##### (1) pGIPec40KSの構築

PecプロモーターとMDV-1のUL46h、UL46hおよびUL49hのPolyAシグナル (Yanagidaら1993) を有する国際公開第W099/18215号公報記載のプラスミドpGIPecを、BamHIとSalIとで切断して得た3278bpの断片に、実施例 3 (4) で構築したpGTPs40K-G-CSをBamHIとSalI断片とで切断して得た1344bpの断片とをライゲーションし、プラスミドpGIPec40KSを構築した。

##### (2) p45/46MG40KSの構築

HVTのUL44-UL46の相同組み換え部位をもつ国際公開第W099/18215号公報記載のプラスミドpNZ45/46SfiのSfiI siteに、上記 (1) で得たpGIPec40KSのBglII断片 (1969bp) を挿入して、プラスミドp45/46MG40KSを構築した。

##### (3) pGICMV (ー) の構築

日本公開特許第1999-192093号公報記載のpGIPecをテンプレートとして、実施例 1 で作製した条件で、プライマーpCMV-1 (配列番号64) とプライマーpPec1R (配列番号65) で、PCRを行い293bpの断片を得た。

pBK-CMV(Stratagene) をテンプレートとして、同様の条件でプライマーpCMV-o1 (配列番号66) とプライマーCMV-R1 (配列番号67) でPCRを行い、341bpの断片を得た。

得られた2つのPCR産物をテンプレートとして、pCMV-1 (配列番号64) とpCMV-R1 (配列番号67) で、PCRを行い604bpの断片を得た。

この604bpの断片をPstIとXbaIで切断して得た589bpの断片と、pG

IPECをPstIとXbaIで切断して得た2765bpの断片とをライゲーションし、pGICMV（－）を構築した。

#### （４）pGHMCSpolyASfiの構築

MDV-1のUL46h、UL46h、UL49hのPolyAシグナル（Yanagidaら1993）とマルチクロニングサイトを持つ国際公開第W099/18215号公報記載のプラスミドpGIMCSpolyASfiをテンプレートとして、プライマーpGHP-F（配列番号68）とプライマーpGHP-R（配列番号69）でPCRを行い、149bpの断片を得た。

この149bpの断片をEcoRIとHindIIIとで切断して得た138bpの断片と、pGIMCSpolyASfiをEcoRIとHindIIIとで切断して得た2635bpの断片とをライゲーションして、pGHMCSpolyASfiを構築した。

#### （５）pGHCMV（－）の構築

上記（４）で得たpGHMCSpolyASfiをPstIとXbaIとで切断して得た2765bpの断片と、上記（３）で得たpGICMV（－）をPstIとXbaIとで切断して得た589bpの断片とをライゲーションをして、pGHCMV（－）を構築した。

#### （６）pHCMV（－）の構築

上記（５）で得たpGHCMV（－）をEcoRIとSalIとで切断して得た3294bpの断片と、5'末端をリン酸化したリンカーLiker1（配列番号70）とリンカーLiker2（配列番号71）とをアニールした産物とをライゲーションし、pGHCMV（－）のMDV-1のUL46h、UL46h、UL49hのPolyAシグナルが欠失したプラスミドpHCMV（－）を構築した。

#### （７）pHCMV-M11（CSG2）の構築

上記（６）で得たpHCMV（－）をBamHIとSalIで切断した3275bpの断片に、実施例５で作製したpNZ29RMG40KM11CS-G2のBamHI-SalI断片3318bpとライゲーションし、プラスミドpHCMV-M11（CSG2）を構築した。



#### (8) pBacの構築

日本公開特許第1999-192093号公報記載のニワトリベータアクチンプロモーターを持つプラスミドpLUC-bacをPstIとXbaIとで切断して得た1515bpの断片と、国際公開第W099/18215号公報記載のpGIMCSpolyASfiをPstIとXbaIとで切断して得た2765bpの断片とをライゲーションして、プラスミドpBacを構築した。

#### (9) pBac(dHS)の構築

上記(8)で得たpBacをHindIIIで部分分解した後XbaIで切断して得た4268bpの断片と、5'末端をリン酸化したLiker3(配列番号72)とLiker4(配列番号73)をアニールした産物とをライゲーションして、プラスミドpBac(dHS)を構築した。

#### (10) pGIBacpA2ndの構築

pBK-CMV(STRATAGENE社)をテンプレートとして、プライマーPolyA-SfiF2(配列番号74)とプライマーPolyA-SalKpn(配列番号75)でPCRを行い、SV40のPolyAシグナルをもつ313bpの断片を得た。この313bpの断片をSfiIとKpnIとで切断して得た297bpの断片と、上記(9)で得たpBac(dHS)をSfiIとKpnIとで切断して得た4222bpの断片とをライゲーションして、pGIBacpA2ndを構築した。

#### (11) pGIBac40KS2ndの構築

国際公開第W097/36924号公報記載のpGTPs40K-Sをテンプレートにしてプライマー40KS-B(配列番号76)と40KG-6R(配列番号22)を用いてPCRを行い、1359bpの断片を得た。この1359bp断片をBamHIとSalIとで切断して得た1345bpの断片と、上記(10)で得たpGIBacpA2ndをBamHIとSalIとで切断して得た4222bpの断片とをライゲーションして、プラスミドpGIBac40KS2ndを構築した。

#### (12) p45/46Bac40KS+2ndの構築

上記(11)で得たpGIBac40KS2ndをBglIで切断して得られた3169b

pの断片を、W097/36924記載のHVTのUL44からUL46の領域（配列番号3）を持つpNZ45/46SfiのSfiIサイトに挿入し、TTM-1遺伝子を有するプラスミドp45/46Bac40KS+2ndを構築した。

(13) p45/46Bac40KS-CMVM11の構築

上記（7）で得たpHCMV-M11(CSG2)をBglIで切断して得られた3940bpの断片を、上記（12）で得たp45/46Bac40KS+2ndのSfiIサイトに挿入し、mgc3遺伝子を有するプラスミドp45/46Bac40KS-CMVM11を構築した。

(14) p45/46Pec40KS+2ndの構築

上記（1）で得たpGIPec40KSをPstIとBamHIとで切断して得た561bpの断片と、上記（12）で得たp45/46Bac40KS+2ndをBamHIとHindIIIとで切断して得た3520bpの断片と、同プラスミドをPstIとHindIIIで切断して得た3613bpの断片とをライゲーションして、改変されたMDVgBシグナルDNAと改変TTM-1遺伝子を有するプラスミドp45/46Pec40KS+2ndを構築した。

(15) pNZ45/46BacpA2ndの構築

上記（11）で得たpGIBacpA2ndをBglIで切断して得た1866bpの断片を、W099/18215記載のpNZ45/46SfiのSfiI siteに挿入し、pNZ45/46BacpA2ndを構築した。

(16) pNZ45/46Bac40KpA+2ndの構築

米国特許第5489430号公報記載のpUTTM-1をテンプレートとして、プライマーpMG40K-1（配列番号77）とプライマー40KG-6R（配列番号22）を用いてPCRを行い、1259bpの断片を得た。この1259bpの断片をBamHIとSalIとで切断して得た1237bpの断片と、上記（15）で得たpNZ45/46BacpA2ndをBamHIとSalIとで切断して得た7317bpの断片とをライゲーションして、プラスミドpNZ45/46Bac40KpA+2ndを構築した。

#### (17) p45/46Bac40K-CMVM11

上記 (7) で得た pHCMV-M11(CSG2) を BglI で切断して得た 3940bp の断片を、上記 (16) で得た pNZ45/46Bac40KpA2nd の SfiI サイトに挿入し、改変された MDVgB シグナル DNA と改変 TTM-1 遺伝子と改変 mgc3 遺伝子を有するプラスミド p45/46Bac40K-CMVM11 を構築した。

### 実施例 7. 組み換え鶏痘用ベクターの作製

#### (1) pNZ29R/40KMGC3 の構築

実施例 6 (11) で構築した pGIBac40KS2nd を BamHI と SalI とで切断して得た 1345bp の断片と、実施例 5 で構築した pNZ29RMG40KM11CS-G2 を EcoT22I と BamHI とで切断して得た 1333bp の断片と、同プラスミドを EcoT22I と SalI とで切断して得た 7722bp の断片とをライゲーションして、改変された MDVgB シグナル DNA と改変 TTM-1 遺伝子と再改変 mgc3 遺伝子を有する組み換え鶏痘用ベクターであるプラスミド pNZ29R/40KMGC3 を構築した。

#### (2) pNZ29RMG40KSM11CS-G2 の構築

実施例 1 で構築した pGTPs40K-Ngly を HindIII と SalI とで切断して得た 1440bp の断片と、実施例 5 で構築した pNZ29RMG40KM11CS-G2 を HindIII と EcoT22I とで切断して得た 1237bp の断片と、同プラスミドを EcoT22I と SalI とで切断して得た 7722bp の断片とをライゲーションして、改変された MDVgB シグナル DNA と改変 TTM-1 遺伝子と再改変 mgc3 遺伝子を有する組み換え鶏痘用ベクターであるプラスミド pNZ29RMG40KSM11CS-G2 を構築した。

#### (3) pGHPs-rgG の構築

参考例 2 で構築した pUC-rgG を BamHI と EcoRI とで切断して得た 75bp の断片と、実施例 4 で構築した pGHPs40KCS-G を BamHI と EcoRI とで切断して得た 2756bp の断片とをライゲーションして、プラスミド pGHPs-rgG を構築した。

#### (4) pNZ29RMG40KSM11(rgG)CS-G2の構築

上記(1)で得たpNZ29R/40KMGC3をSfiIとSalIとで切断して得た3418bpの断片をさらにEcoRIで切断して得た3129bpの断片と、同じpNZ29R/40KMGC3をSfiIとSalIとで切断して得た6982bpの断片と、参考例2で構築したpGHPs-rgGをSfiIとEcoRIとで切断して得た176bpの断片とをライゲーションして、改変されたrgG遺伝子と改変TTM-1遺伝子と再改変mgc3遺伝子を有する組み換え鶏痘用ベクターであるプラスミドpNZ29RMG40KSM11(rgG)CS-G2を構築した。

#### 実施例8. 組み換え鶏痘ウイルスの純化

単層のCEFに鶏痘生ワクチンであるBLEN株 (FP-Blen Select Laboratories) をM.O.I.=0.1で感染させて、3時間後にこれらの細胞をトリプシン処理ではがし、細胞懸濁液とした。この懸濁液中の $2 \times 10^7$ 個の細胞と、上記実施例において構築した表1記載の組み換え鶏痘用ベクター各 $10 \mu\text{g}$ とを混合し、Saline G(0.14M NaCl、0.2mM KCl、1.1mMリン酸水素二ナトリウム、1.5mMリン酸水素一カリウム、0.5mM塩化マグネシウム・6水和物、0.011%グルコース)に懸濁し、室温においてジーンパルサー (Bio-Rad社) を用いて、 $3.0 \text{KVcm}^{-1}$ 、0.4msecの条件下でエレクトロポレーションした。組み換え鶏痘用ベクターを導入した細胞を、その後72~120時間培養し、3回の凍結融解によって細胞を融解し、組み換え鶏痘ウイルスを含むウイルスを回収した。組み換え鶏痘用ベクターと、そのベクターから得られた組み換え鶏痘ウイルス名との関係を表-1に示す。

表－１：組み換え鶏痘ウイルス名と組み換え用ベクターの関係

組み換え鶏痘用ベクター	組み換え鶏痘ウイルス
pNZ29R/40K-S(d1-lacZ)	rFPV-B/MG40-
pNZ29RMG40KM11CS-G	rFPV-B/MG40/M11
pNZ1829R/40K-G-CS	rFPV-B/MG40-S
pNZ29R/40KMGC3	rFPV-B/MG-1
pNZ29RMG40KS(-G)M11CS-G2	rFPV-B/MG-2
pNZ29RMG40KSM11(rgG)CS-G2	rFPV-B/MG-3

回収したウイルスは、BPA (Black Plaque Assay) 法によって純化を行った。

回収したウイルス液を単層のCEFに感染させ、生育培地を含んだ寒天培地を重層した。2～3日後、ウイルスプラークが確認できた後、寒天と共にウイルスプラークを、パスツールピペットなどを用いて吸い取り、生育培地に懸濁して保存した。一方、残りのプラークのあるCEFは、寒天をとりさり、冷メタノールなどで固定を行った。TTMG-1蛋白質を大腸菌で発現させた蛋白質をウサギに免疫して得た抗血清（抗TTMG-1抗血清）を通常細胞培養に用いられるマグネシウムを含まないダルベッコ (Dulbecco's) リン酸バッファー（大日本製薬社製；以下、PBS（－）という）で約500倍に希釈したものを、22～25℃で2時間、プラークと反応させた。結合していない抗体を3%Non-fat dried milk in PBS（－）で3度洗浄した後、ビオチン化抗ウサギ抗体（ヒツジ、Biosource社）で22～25℃、2時間、プラークと反応させた。

反応後の抗体をPBSで洗浄した後、アビジン－ビオチン－アルカリフォスフォターゼComplex(Vector laboratories) で反応させた。未反応のアビジン－ビオチン－アルカリフォスフォターゼComple

xをPBS（－）でリンスすることによって洗い流した後、アルカリフォスフォターゼの基質であるBCIP/NBT（ロシュ社製）を用いて、濃紺から黒色に呈色させた。このBPAによって陽性のプラークに対応する懸濁ウイルス液を再度、CEFに感染させることによって、さらに同様の操作を3～4回繰り返して全てのプラークがBPAにより陽性となるまで、行った。尚、組み換え体の遺伝子構造は、サザンハイブリダイゼーションおよび接合部のDNA配列のシーケンスによって確認した。

#### 実施例 9. 組み換えHVTの純化

Morganら（1990）の方法に従って、HVT-DNAは回収した。具体的な回収方法は以下の通りである。

$10^5$  PFU程度のHVT、FC126株（ATCC VR-584B）を約 $3 \times 10^7$ 個のCEFに感染させ、2～3日培養した後、lysis Buffer（0.5% SDS、10mM Tris（pH8.0）、100mM NaCl、1mM EDTA、200  $\mu$ g/ml ProteinaseK）を4ml加えて、37℃で4時間インキュベートした後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行って、HVT-DNAを回収した。

上記の実施例において得た表2記載の組み換えHVT用ベクターは、制限酵素を用いて、相同部位や外来遺伝子を含まない部分で、切断し、直鎖状にしておいた。

トリプシンを用いて回収した、約 $3 \times 10^6$ 個のCEFをSaline G（0.14M NaCl、0.2mM KCl、1.1mMリン酸水素二ナトリウム、1.5mMリン酸水素一カリウム、0.5mM塩化マグネシウム・6水和物、0.011%グルコース）に懸濁し、先に用意していたHVT-DNA 10～30  $\mu$ gと、直鎖状にした組み換え用ベクター10～30  $\mu$ gをそれぞれ室温においてジーンパルサー（Bio-Rad社製）を用いて、 $0.5 \text{KVcm}^{-1}$ 、0.4msecの条件下でエレクトロポレーションした。この細胞懸濁液を直径6cmの細胞皿に播き、生育培地を加えて、5～7日間培養した。これを回収

して、組み換えHVTを含むウイルスを回収した。この組み換えHVTは限界希釈法により、純化を行った。純化の具体的な方法は以下の通りである。

約 $2 \times 10^6$ 個程度のCEFと共に段階希釈したウイルス液と共に、96well plateにいた。3～5日培養して、プラークが出現後、レプリカを作製した。プレートのひとつを実施例8のBPA法と同様の方法を用いて、TTM-1遺伝子が発現している組み換えHVTを選択した。組み換え鶏痘ウイルスと同様、陽性のプラークに対応するレプリカのウイルス液を再度CEFに感染させ、全てのプラークがBPA法により陽性となるまで、同様の操作を3～4回繰り返した。

組み換えHVT用ベクターと、そのベクターから得られた組み換えHVTとの関係を表-2に示す。

表-2：組み換えHVT名と組み換え用ベクターの関係

組み換えHVT用ベクター	組み換えHVT
p45/46MG40KS	rHVT/PecMG40KS
p45/46Bac40KS-CMVM11	rHVT/Bac40KS-CMVM11
pNZ45/46Pec40KpA+2nd	rHVT/PecMG40KS+2nd
p45/46Bac40K-CMVM11	rHVT/Bac40K-CMVM11

尚、組み換え体の遺伝子構造は、サザンハイブリダイゼーションおよび接合部のDNA配列のシーケンスによって確認した。

#### 実施例10. 組み換え体の発現蛋白質の確認（BPA法）

実施例8および9で得た組み換え鶏痘ウイルスおよび組み換えHVTは全て、TTM-1遺伝子又は改変TTM-1遺伝子を有し、TTMG-1抗原を発現することを各実施例においてBPA法により既に確認している。

また、実施例8および9で得たmgc3遺伝子又は改変mgc3遺伝子を

もつ組み換えウイルス、rFPV-B/MG40/M11、rFPV-B/MG-1、rFPV-B/MG-2、rFPV-B/MG-3、rHVT/Bac40KS-CMVM11、rHVT/Bac40K-CMVM11については、Yoshidaら（2000）で作製したMGC3抗原に対するマウスモノクローナル抗体Mab 35A6を用いて、実施例8と同様にBPA法を行い（ただし、二次抗体はビオチン化抗マウス抗体（ヒツジ、Biosource社）である点のみ異なる）、MGC3抗原の発現を確認した。

#### 実施例11. 組み換え体の発現蛋白質の確認（ウエスタンブロット法）

組み換えウイルスの発現蛋白質の分子量を、ウエスタンブロット法を用いて測定した。ウエスタンブロット法による操作は以下の通りである。

組み換えウイルスを感染させた単層のCEFをSDS-GELローディングバッファーを用いて可溶化した。サンプルによっては、この状態で糖鎖分解酵素、Endoglycosidase H(Endo H;Boelinger-Mannheim)やPNGaseF(Endo F;Boelinger-Mannheim)を用いて糖鎖の消化を行った。これらサンプルを通常の変成還元状態のSDS-PAGE電気泳動を行った。蛋白質は、ゲルからPVDF膜（Immobilon-P、Millipore社）に転写した。このPVDF膜を実施例10で述べた抗TTMG-1抗血清またはMab 35A6とインキュベートし、Tris Buffered Saline with Tween20(T-TBS:0.1M Tris-Cl(pH7.5)、0.9%NaCl、0.1%Tween20(Sigma-aldrich社製))でリンスした。メンブレンはビオチン化二次抗体（抗TTMG-1抗血清の場合は抗ウサギ（ヤギ）、Mab 35A6の場合は抗マウス（ヤギ）Biosource社）でインキュベートした。T-TBSでリンスした後、アビジン-ビオチン-アルカリフォスファターゼComplex(Vector laboratories)で反応させた。未反応のアビジン-ビオチン-アルカリフォスファターゼComplexをT-TBSでリンスすることによって洗い流した後、アルカリフォスファターゼの基質であるBCIP/NBT（



ロシュ)を用いて、濃紺から黒色に呈色させた。

実施例 8 で得た組み換え鶏痘ウイルス rFPV-B/MG40/M11(Lane3)が TTMG-1 抗原を発現することを、抗 TTMG-1 抗血清を用いたウエスタンブロット法により確認した(図 1)。コントロールとして、親ウイルスである鶏痘ウイルス、BLEN 株 (Lane1) および、国際公開第 W097/36924 号公報記載の糖鎖をもつ TTMG-1 抗原に MDVgB シグナルをインフレームに接続した組み換え鶏痘ウイルス、40K-S(Lane2)、Yoshida ら (2000) が報告した MGC3 抗原を発現する組み換え鶏痘ウイルス recFPV-MGC3(Lane4) を用いた。

図 1 に示すように、N-グリコシレーションサイトをもつ TTMG-1 抗原を発現する 40K-S は (Lane2)、約 60kd の TTMG-1 抗原を発現した。一方、N-グリコシレーションサイトを改変した TTMG-1 抗原を発現する rFPV-B/MG40/M11(Lane3) は、約 50kd の TTMG-1 抗原を発現した。これは N-グリコシレーションサイトを改変した TTMG-1 に加えて MDVgB シグナルを加えたアミノ酸配列からの予想値 48.9Kd と一致した。尚、陰性コントロールである TTMG-1 抗原を発現しない親ウイルス (Lane1) および recFPV-MGC3(Lane4) では、特異的なバンドはみられなかった。

実施例 8 で得た組み換え鶏痘ウイルス rFPV-B/MG40-S(Lane5) と実施例 9 で得た組み換え HVT rHVT/PecMG40KS(Lane1&2) が、TTMG-1 抗原を発現することを、抗 TTMG-1 抗血清を用いたウエスタンブロット法により確認した(図 2)。コントロールとして、NDV の HN および F 抗原を発現する日本公開特許第 1999-192093 号公報記載の rHVT HF-PecHNF(Lane3) と、親ウイルスである鶏痘ウイルス、BLEN 株 (Lane4)、国際公開第 W097/36924 号公報記載の 40K-S(Lane5) を用いた。レーン 1 と 2 はクローンが異なるだけで、同じ構造を持つ組み換え HVT である。N-グリコシレーションサイトを改変した TTMG-1

抗原を発現するrFPV-B/MG40-S(Lane5) とrHVT/PecMG40KS(Lane1&2) は、図1のrFPV-B/MG40/M11(Lane3) と同じく、約50kdのTTMG-1抗原を発現した。これは、rFPV-B/MG40/M11と同様に、N-グリコシレーションサイトを改変したTTMG-1に加えてMDVgBシグナルを加えたアミノ酸配列からの予想値48.9Kdと一致した。一方、糖鎖をもつTTMG-1抗原を発現する40K-Sは(Lane6) は、図1のLane2と同じウイルスであるが、約60kdのTTMG-1抗原を発現した。NDVを発現するHF-PecHNF(Lane3) では、約50kdのところにバンドがあるように見えるが、これは、レーン2からのコンタミネーション(contamination)であることを他の実験で確認した。また、陰性コントロールであるFPV親株(Lane4) ではバンドは見られなかった。つまり、N-グリコシレーションサイトを改変したTTMG-1とMDVgBシグナルとからなる融合蛋白質を発現する組み換えFPVおよびHVTはN-グリコシル化されていないことが証明された。

実施例8で得た組み換え鶏痘ウイルスrFPV-B/MG-1(Lane2&3) がMGC3抗原を発現することをMab 35A6を用いたウエスタンブロット法により確認した(図3)。陰性コントロールとして、親ウイルスである鶏痘ウイルス、BLEN株(Lane4) を用いた。Yoshidaら(2000)によると、recFPV-MGC3-Sが発現する、N-グリコシレーションサイトを有するMDVgBシグナルとMGC3との融合蛋白質の大きさは、145kdである。上記実施例で得られたFPV-B/MG-1のmgc3遺伝子産物である、N-グリコシレーションサイトを改変したMGC3抗原とMDVgBシグナルとの融合蛋白質の大きさは、120kdである(Lane2&3)。これはアミノ酸配列から推定した糖鎖が付加されない(N-グリコシル化されない)場合の分子量と一致する。またこの120kdというMGC3抗原の大きさはYoshidaら(2000)によるrecFPV-MGC3-SのMGC3抗原をEndoglycosidase HやPNGaseFで処理し、糖鎖を除去したMGC3抗原

の大きさが120kdであるという事実と一致する。

さらに、実施例 8 で得た組み換え鶏痘ウイルス rFPV-B/MG-1(Lane 1~3) について、発現蛋白質をPNGaseF処理 (Lane1) 、Endoglycosidase H処理 (Lane2) の処理後、Mab 35A6を用いたウエスタンブロット法を行った (図 4) 。その結果、Endoglycosidase HやPNGaseFの処理にもかかわらず、120kdであり、N-グリコシル化されていないことが証明された。これは、同様に、Yoshidaら (2000) の示した上述の事実と一致する。

#### 実施例12. 組み換え体の発現蛋白質の確認 (免疫沈降法)

さらに、免疫沈降法を用いて、組み換えウイルスの発現蛋白質の検討を行った。

組み換えウイルスを感染させた単層のCEFの生育培地をメチオニン不含MEM培地 (0.5% FCS) に1時間インキュベートした。その後、Met不含MEM培地 (0.5% FCS) に [ $^{35}$ S] -Metアイソトープ (100mCi/ml) を加えた培地で37℃ 16~48時間インキュベートした。この細胞を回収した後、Lysing Buffer(50mM Tris(pH7.5)、150mM NaCl、0.5% NP-40、0.1% Aprotinin) を加えて可溶化した。遠心して沈殿を除いた後、抗TTMG-1抗血清またはMab35A6とProtein G-Agarose (ロシュ1243233) を混合して4℃でインキュベートした。遠心により、沈殿を回収し、Washing Buffer(50mM Tris(pH7.5)、150mM NaCl、1% Triton X-100、1% デオキシコール酸ナトリウム (NaDOC) 、0.1% SDS) で洗浄し、SDS Sample Bufferを加えて100℃10分煮沸して上清をサンプルとした。各サンプルについてSDS-PAGEを行い、ゲルを乾燥してX線フィルムを感光させて可視化した。

実施例 8 で得た組み換え鶏痘ウイルス rFPV-B/MG40/M11(Lane3) について、抗TTMG-1抗血清 (パネルA) およびMab 35A6 (パネルB) を用いた免疫沈降法により、発現蛋白質の検討を行った (図 5)

。パネル A では TTMG-1 抗原の発現を、パネル B では MGC3 抗原の発現を確認できる。国際公開第 W097/36924 号公報記載の組み換え鶏痘ウイルス、40K-S (Lane2) は、パネル B においてコントロールであり、Yoshida ら (2000) 記載の組み換え鶏痘ウイルス recFPV-MGC3 (Lane4) は、パネル A においてコントロールである。親ウイルスである鶏痘ウイルス、BLEN 株 (Lane1) は、パネル A、B 共にコントロールである。抗 TTMG-1 抗血清を用いた免疫沈降では、改変 TTMG-1 遺伝子を有する rFPV-B/MG40/M11 (Lane3) は、実施例 11 のウエスタンブロット法の結果と同じく、約 50kd の N-グリコシル化されない TTMG-1 抗原を発現することを確認した。一方、改変されていない TTMG-1 遺伝子を有する 40K-S (Lane2) では、約 60kd の N-グリコシル化された TTMG-1 抗原を発現した。また、Mab 35A6 を用いた免疫沈降では、再改変 mgc3 遺伝子を有する rFPV-B/MG40/M11 (Lane3) は、実施例 11 のウエスタンブロット法の結果と同じく、約 120kd の N-グリコシル化されない MGC-3 抗原を発現することを確認した。

一方、改変されていないMGC-3抗原を発現するrecFPV-MGC3は、実施例11のウェスタンブロット法の結果と同じく、約140kdのN-グリコシル化されたMGC-3抗原を発現した。

以上、実施例10～12により証明された通り、N-グリコシレーションサイトを欠失することにより、N結合型糖鎖の付加（N-グリコシル化）を防ぐことができる。

参考例 3. 組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験

攻撃試験は基本的に動物用生物学的製剤基準に則って行った。以下、簡単にその方法を記述する。白色レグホンSPF鶏卵（鶏種：Line-M、日生研）を用いて、孵化後5週間後に組み換えFPVを $10^4$  pfu/羽となるように翼膜に穿刺接種した。組み換えFPVは、国際公開第W097/36924号公報記載の組み換えFPV、40K-S、およびYoshidaら（20

00) が報告したrecFPV-MGC3-Sの2種類を用いた。ワクチン接種後2週後にMG強毒株R株をチャレンジした。チャレンジ法は、動物用生物学的製剤基準に則って、気管に直接 $4.8 \times 10^4$  CFU/羽になるようにチャレンジし感染14日後に屠殺剖検し、気管の病理組織標本を作製し、気管粘膜の暑さと組織所見をもとに気管病変スコアを測定した。国際公開第W097/36924号公報記載のようにスコアの基準は製剤基準どおりであり、群内の各鶏の気管病変スコアの平均を各群のスコアとした。この結果を表-3に示す。

表-3：組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験-1

	羽数	気管病変スコア
Challenge Controls	10	2.53
40K-S	10	1.96
recFPV-MGC3-S	10	2.78

この結果より、recFPV-MGC3-Sは、全く効果がなかったが、W097/36924記載の組み換えFPV、40K-Sはワクチン効果が確認された。

#### 実施例13. 組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験

攻撃試験は基本的にUSDA-9CFRに則って行った。以下、簡単にその方法を記述する。白色レグホンSPF鶏卵（鶏種：Line-M、日生研）を用いて、孵化後4週間後に組み換えFPVを $10^4$  pfu/羽となるように翼膜に穿刺接種した。組み換えFPVは、国際公開第W097/36924号公報記載の組み換えFPV、40K-S、実施例8で得たrFPV-B/MG40-S、および実施例8で得たrFPV-B/MG40-の3種類を用いた。コントロールとして、組み換え体の親ウイルスである、FPV、BLEN株も接種した。市販マイコプラズマガリセプチカム生ワクチンは用法どおり接種した。ワクチン接種後3週後にMG強毒株R株を、 $1.0 \times 10^{10}$  CCU

の菌液を1分間噴霧することによって実施し、チャレンジ後10日目に鶏を屠殺し、気嚢病変スコアをEvans等の方法で評価した。具体的な評価の方法は以下の通りである。

スコア0：異常なし

スコア1：気嚢膜の肥厚による混濁もしくは灰色化、または黄色浸出物が斑点状に見られる。但し1，2の気嚢に限られる

スコア2：1～2カ所の気嚢で気嚢膜が肥厚し、泡状の黄色浸出物や灰色化が容易に判別できる。

スコア3：ひどい浸出物や気嚢炎による肥厚が3カ所以上の気嚢に観察される。

スコア4：殆どすべての気嚢においてひどい浸出物の堆積が観察でき、肥厚も顕著に見られる。

各鶏のスコアを求め、鶏群内で平均し平均スコアとした。有意差検定は非接種チャレンジ群（Challenge Controls）とワクチネーション群の間において、Mann-Whitney U-testで検定した。

表－4：組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験－2

virus	羽数	平均スコア	有意差
rFPV-B/MG40-S	10	1.00	*
rFPV-B/MG40-	10	1.88	*
40K-S	10	1.78	*
Live Mg Vaccine	10	2.10	*
Parent FPV	10	3.38	
Challenge Controls	10	2.90	

\*：1%危険率で有意差あり

この結果より、組み換えFPV3種全てにワクチン効果が認められ、

生ワクチンと同程度以上のワクチン効果が示された。しかも、3種の中でも、N-グリコシル化されたTTMG-1抗原を発現するrFPV-B/MG40-や40K-Sよりも、N-グリコシル化されないTTMG-1抗原を発現するrFPV-B/MG40-Sの方がワクチン効果の高いことが判明した。

#### 実施例14. 組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験

攻撃試験は実施例13と同様で、主に異なる部分のみ記述する。白色レグホンSPF鶏卵（Line-M、日生研）を用いて、孵化後4週間後に組み換えFPVを $10^4$  pfu/羽となるように翼膜に穿刺接種した。組み換えFPVは、実施例8で得たrFPV-B/MG40/M11を用いた。市販マイコプラズマガリセプチカム生ワクチンは用法どおり接種した。ワクチン接種後3週後にMG強毒株R株を、 $10^{10.67}$  CCUの菌液を1分間噴霧することによって実施し、チャレンジ後10日目に鶏を屠殺し、気嚢病変スコアをEvans等の方法で評価した。実施例13と同様に、有意差検定は非接種チャレンジ群とワクチネーション群の間において、Mann-Whitney U-testで検定した。

表－5：組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験－3

Group	羽数	平均スコア	有意差
rFPV-B/40K/M11	9	1.67	*
Live Mg Vaccine	10	1.90	* 2
Challenge Controls	9	3.33	

\*：1%危険率で有意差あり

\* 2：5%危険率で有意差あり

この結果より、N-グリコシル化されないTTMG-1抗原とMGC-3抗原を発現するrFPV-B/40K/M11において、生ワクチンをしのぐワクチン効果が認められた。

# 実施例15. 組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験

攻撃試験は実施例13と同様で、主に異なる部分のみ記述する。白色レグホンSPF鶏卵（SPAFAS社）を用いて、孵化後4週間後に組み換えFPVを $10^4$  TCID<sub>50</sub>/羽となるように翼膜に穿刺接種した。組み換えFPVは、実施例8で得たrFPV-B/MG40-SとrFPV-B/MG40/M11の2種類を用いた。市販マイコプラズマガリセプチカム生ワクチンは用法どおり接種した。ワクチン接種後3週後にMG強毒株R株を、約 $1.0 \times 10^{8.86}$  CCUの菌液を1分間噴霧することによって実施し、チャレンジ後10日目に鶏を屠殺し、気嚢病変スコアをEvans等の方法で評価した。実施例13と同様に、有意差検定は非接種チャレンジ群（challenge controls）とワクチネーション群の間において、Mann-Whitney U-testで検定した。

表－6：組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験－4

Group	羽数	平均スコア	有意差
Challenge Controls	20	2.15	
Live Mg Vaccine	20	0.60	*
rFPV-B/MG40-S	20	1.7	
rFPV-B/40K/M11	20	1.15	*
Negative Controls	10	0	

\*：1%危険率で有意差あり

この結果より、N-グリコシル化されないTTMG-1抗原を発現するrFPV-B/MG40-SとrFPV-B/MG40/M11の2つの組み換え体のワクチン効果が確認された。さらに、N-グリコシル化されないTTMG-1抗原と、N-グリコシル化されないMGC3抗原とを発現するrFPV-B/40K/M11においては、N-グリコシル化されないTTMG-1抗原のみを発現する



rFPV-B/MG40-Sをしのぐワクチン効果が確認された。

#### 実施例16. 組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験

攻撃試験は実施例13と同様で、主に異なる部分のみ記述する。白色レグホンSPF鶏卵（Line-M、日生研）を用いて、孵化後4週間後に組み換えFPVを $10^4$  pfu/羽となるように翼膜に穿刺接種した。組み換えFPVは、実施例8で得べたrFPV-B/MG-1～3の3種類を用いた。ワクチン接種後3週後にMG強毒株R株を、 $1.0 \times 10^{9.85}$  CCUの菌液を1分間噴霧することによって実施し、チャレンジ後10日目に鶏を屠殺し、気嚢病変スコアをEvans等の方法で評価した。実施例17と同様に、有意差検定は非接種チャレンジ群とワクチネーション群の間において、Mann-Whitney U-testで検定した。

表－7：組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験－5

Group	羽数	平均スコア	有意差
Challenge Controls	20	3.50	
rFPV-B/MG-1	20	1.35	*
rFPV-B/MG-2	19	1.74	*
rFPV-B/MG-3	18	1.26	*
Negative Controls	5	0.00	

\*：1%危険率で有意差あり

この結果より、N-グリコシル化されないMGC3抗原を発現しているrFPV-B/MG-1～3のすべてのワクチン効果が確認された。

#### 実施例16. 組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験

攻撃試験は実施例13と同様で、主に異なる部分のみ記述する。白色レグホンSPF鶏卵（SPAFAS）を用いて、孵化後8週間後に組み換えFPVを $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub> pfu/羽となるように翼膜に穿刺接種した。組

み換えFPVは、実施例 9 で得たrFPV-B/MG40-とrFPV-B/MG40/M11の 2 種類を用いた。マイコプラズマガリセプチカム生ワクチンは用法どおり接種した。ワクチン接種後 3 週後にMG強毒株 R 株を、 $1.0 \times 10^{8.6}$  CCUの菌液を 1 分間噴霧することによって実施し、チャレンジ後 11 日目に鶏を屠殺し、気嚢病変スコアをEvans等の方法で評価した。実施例 14 と同様に、有意差検定は非接種チャレンジ群とワクチネーション群の間において、Mann-Whitney U-testで検定した。

表－ 8：組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験－ 6

Group	羽数	平均スコア	有意差
Challenge Controls	30	1.78	
rFPV-B/MG-1	30	0.37	*
rFPV-B/MG-2	30	0.39	*
rFPV-B/MG-3	30	0.56	*
Live Mg Vaccine	30	0.43	*
Negative Controls	5	0.00	

\*：1 % 危険率で有意差あり

この結果より、N－グリコシル化されないMGC3抗原を発現しているrFPV-B/MG-1～3のすべてのワクチン効果が確認された。

#### 実施例 17. 組み換えFPVと組み換えHVT接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験

攻撃試験は実施例 13 と同様であり、異なる部分のみ記述する。白色レグホンSPF鶏卵（Line-M、日生研）を用いて、孵化後 3 日後に、組み換えHVTを $3 \times 10^3$  PFU／羽となるように皮下に接種し、孵化 3 週間後に組み換えFPVを $10^4$  TCID<sub>50</sub>／羽となるように翼膜に穿刺接種した。組み換えHVTは、実施例 9 で得たrHVT/PecMG40KSとrHVT/Bac4

OKS-CMVM11を用いた。組み換えFPVは、実施例8で得たrFPV/MG-1を用いた。市販マイコプラズマガリセプチカム生ワクチンは用法どおり、孵化3週間後に接種した。孵化7週間後にMG強毒株R株を、 $1.0 \times 10^{9.4}$  CCUの菌液を1分間噴霧することによって実施し、チャレンジ後10日目に鶏を屠殺し、気嚢病変スコアをEvans等の方法で評価した。実施例13と同様に、有意差検定は非接種チャレンジ群とワクチネーション群の間において、Mann-Whitney U-testで検定した。

表－9：組み換えFPVと組み換えHVT接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験

Group	羽数	平均スコア	有意差
rFPV-B/MG-1	15	1.20	* 2
rHVT/PecMG40KS	16	1.50	*
rHVT/Bac40KS-CMVM11	15	2.00	
Live Mg Vaccine	14	1.79	*
Challenge Controls	12	2.75	

\*：1%危険率で有意差あり

\*2：5%危険率で有意差あり

この結果より、N-グリコシル化されないTTMG-1抗原を発現している本発明に属する組み換えHVT、rHVT/PecMG40KSと、N-グリコシル化されないMGC3抗原を発現しているrFPV-B/MG-1のワクチン効果が確認された。さらに、N-グリコシル化されないTTMG-1抗原とN-グリコシル化されないMGC3抗原とを発現しているrHVT/Bac40KS-CMVM11のワクチン効果が確認された。

#### 実施例18. 組み換えHVT接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験

攻撃試験は実施例13と同様で、主に異なる部分のみ記述する。白

色レグホンSPF鶏卵（Line-M、日生研）を用いて、孵化日に、組み換えHVTを $10^3$ または $10^4$  TCID<sub>50</sub>／羽となるように皮下に接種した。組み換えHVTは、実施例9で構築したrHVT/PecMG40KSを用いた。市販マイコプラズマガリセプチカム生ワクチンは用法どおり、孵化3週間後に接種した。孵化7週間後にMG強毒株R株を、 $1.0 \times 10^{5.59}$  CCUの菌液を1分間噴霧することによって実施し、チャレンジ後10日目に鶏を屠殺し、気嚢病変スコアをEvans等の方法で評価した。実施例13と同様に、有意差検定は非接種チャレンジ群とワクチネーション群の間において、Mann-Whitney U-testで検定した。

表－10：組み換えHVT接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験

Group	Dose log <sub>10</sub> /chick	羽数	平均スコア	有意差
rHVT/PecMG40KS	4.0	8	2.00	*
rHVT/PecMG40KS	3.0	7	2.57	*
Live Mg Vaccine Label		10	2.10	*
Challenge Controls		12	3.50	
Negative Controls		5	0.00	

\*：1%危険率で有意差あり

この結果より、N-グリコシル化されないTTMG-1抗原を発現している組み換えHVT、rHVT/PecMG40KSのワクチン効果が確認された。

#### Reference Cited

#### US. PATENTE DOCUMENTS

5,180,675	1/1993	Drillien et al.	435/235.1
5,387,519	2/1995	Yanagida et al.	435/235.1
5,489,430	2/1996	Saito et al.	424/190.1

5,766,594	6/1998	Kodama et al.	424/190.1
5,871,742	2/1999	Saitoh et al.	424/199.1

#### FOREIGN PATENT DOCUMENTS

W097/24370	7/1997	WIPO
W097/36924	10/1997	WIPO
W099/18215	4/1999	WIPO
2766984	4/1998	Japan.
2001-188	1/2001	Japan.

#### OTHER PUBLICATIONS

Andre, S. et al., "Increased immune response elicited by DN A vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage." J. Virol. 72:1497-1503. 1998.

Davison, A. J. and B. Moss. "Structure of vaccinia virus early promoters." J. Mol. Biol. 210:749-769. 1989.

Davison, A. J. and B. Moss. "Structure of vaccinia virus late promoters." J. Mol. Biol. 210:771-784. 1989.

Greuel, B. T. et al., "Transcriptional activity of the Rous sarcoma virus long terminal repeat correlates with binding of a factor to an upstream CCAAT box in vitro." Virology 177:33-43. 1990.

Gunning, P. et al., "A human beta-actin expression vector

system directs high-level accumulation of antisense transcripts." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 84:4831-4835. 1987.

Kost, T. A. et al., "The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene." Nucleic. Acids. Res. 11:8287-8301. 1983.

Morgan, R. W. et al., "Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek's disease virus DNA." Avian Dis. 34:345-351. 1990.

Nakamura, Y. et al., "Condon usage tabulated from the international DNA sequence databases." Nucleic. Acids. Res. 24:214-215. 1996.

Ross L. 5、16th International Herpes Workshop (1991)

Ross, L. J. N. et al., "Construction and properties of a turkey herpesvirus recombinant expressing the Marek's disease virus homologue of glycoprotein B of herpes simplex virus." J. Gen. Virol. 74:371-377. 1993.

Sakaguchi, M. et al., "Construction of recombinant Marek's disease virus type 1 (MDV1) expressing the Escherichia coli lacZ gene as a possible live vaccine vector: the US10 gene of MDV1 as a stable insertion site." Vaccine 12:953-957. 1994.

Sondermeijer, P. J. et al., "Avian herpesvirus as a live viral vector for the expression of heterologous antigens." Vaccine 11:349-358. 1993.

Stinski, M. F. and T. J. Roehr. "Activation of the major immediate early gene of human cytomegalovirus by cis-acting elements in the promoter-regulatory sequence and by virus-specific trans-acting components." J. Virol. 55:431-441. 1985.

Yanagida, N. et al., "Recombinant fowlpox viruses expressing the glycoprotein B homolog and the pp38 gene of Marek's disease virus." Journal of Virology 66:1402-1408. 1992.

Yanagida, N. et al., "Nucleotide and predicted amino acid sequences of Marek's disease virus homologues of herpes simplex virus major tegument proteins." J. Gen. Virol. 74:1837-1845. 1993.

Yoshida, S. et al., "Identification and expression of a Mycoplasma gallisepticum surface antigen recognized by a monoclonal antibody capable of inhibiting both growth and metabolism" Infect. Immun., vol. 68, pp. 3186-3192, 2000

Weir, J. P. and B. Moss. "Regulation of expression and nucleotide sequence of a late vaccinia virus gene." J. Virol. 51:662-669. 1984.

配列表 フリーテキスト

Sequence No. 1	TTM-1遺伝子 (EcoRI以降)
Sequence No. 2	mgc3遺伝子
Sequence No. 3	HVT-UL44-46挿入部位
Sequence No. 4	FPV-29位挿入部位
Sequence No. 5	MDVgBシグナル (アミノ酸)
Sequence No. 6	改変MDVgBシグナル (アミノ酸)
Sequence No. 7	改変MDVgBシグナル (遺伝子)
Sequence No. 8	Rabies Virus G糖タンパクシグナル (アミノ酸)
Sequence No. 9	Rabies gGシグナル用合成DNA-1: 1BN
Sequence No. 10	Rabies gGシグナル用合成DNA-2: 1BC
Sequence No. 11	改変Rabies Virus G糖タンパクシグナル
Sequence No. 12	pNZ40K-SのTTM-1部分 (アミノ酸)
Sequence No. 13	合成DNA (プライマー) : 40KG-1 (23mer)
Sequence No. 14	合成DNA (プライマー) : 40KG-2R (22mer)
Sequence No. 15	合成DNA (プライマー) : 40KG-2 (23mer)
Sequence No. 16	合成DNA (プライマー) : 40KG-3R (21mer)
Sequence No. 17	合成DNA (プライマー) : 40KG-3A (36mer)
Sequence No. 18	合成DNA (プライマー) : 40KG-4RA (34mer)
Sequence No. 19	合成DNA (プライマー) : 40KG-4 (24mer)
Sequence No. 20	合成DNA (プライマー) : 40KG-5R (28mer)
Sequence No. 21	合成DNA (プライマー) : 40KG-5 (27mer)
Sequence No. 22	合成DNA (プライマー) : 40KG-6R (37mer)
Sequence No. 23	改変したpNZ40K-SのTTM-1部分(BglIIより下流)(アミノ酸)
Sequence No. 24	改変したpNZ40K-SのTTM-1部分(BglIIより下流) (遺伝子)
Sequence No. 25	mgc3遺伝子がコードするMGC3蛋白 (アミノ酸)
Sequence No. 26	合成DNA (プライマー) : M11-B (26mer)



Sequence No. 27	合成DNA (プライマー) : M11-2R (20mer)
Sequence No. 28	合成DNA (プライマー) : M11-2 (20mer)
Sequence No. 29	合成DNA (プライマー) : M11-3R (20mer)
Sequence No. 30	合成DNA (プライマー) : M11-3 (20mer)
Sequence No. 31	合成DNA (プライマー) : M11-4RB (30mer)
Sequence No. 32	合成DNA (プライマー) : M11-4B (30mer)
Sequence No. 33	合成DNA (プライマー) : M11-5R (20mer)
Sequence No. 34	合成DNA (プライマー) : M11-5A (30mer)
Sequence No. 35	合成DNA (プライマー) : M11-7RA (30mer)
Sequence No. 36	合成DNA (プライマー) : M11-7 (20mer)
Sequence No. 37	合成DNA (プライマー) : M11- KR (20mer)
Sequence No. 38	合成DNA (プライマー) : M11- K (20mer)
Sequence No. 39	合成DNA (プライマー) : M11- 8R (30mer)
Sequence No. 40	合成DNA (プライマー) : M11- 8 (30mer)
Sequence No. 41	合成DNA (プライマー) : M11- 10R (25mer)
Sequence No. 42	合成DNA (プライマー) : M11- 10 (25mer)
Sequence No. 43	合成DNA (プライマー) : M11- 12RA (30mer)
Sequence No. 44	合成DNA (プライマー) : M11- 12A (30mer)
Sequence No. 45	合成DNA (プライマー) : M11- XR (20mer)
Sequence No. 46	合成DNA (プライマー) : M11- XA (30mer)
Sequence No. 47	合成DNA (プライマー) : M11- 13RA (30mer)
Sequence No. 48	合成DNA (プライマー) : M11- 13A (30mer)
Sequence No. 49	合成DNA (プライマー) : M11- 14RA (30mer)
Sequence No. 50	合成DNA (プライマー) : M11- 14A (30mer)
Sequence No. 51	合成DNA (プライマー) : M11- 15RA (30mer)
Sequence No. 52	合成DNA (プライマー) : M11- 15A (30mer)
Sequence No. 53	合成DNA (プライマー) : M11- 16RA (30mer)

Sequence No. 54	合成DNA (プライマー) : M11- 16A (30mer)
Sequence No. 55	合成DNA (プライマー) : M11- GTR (30mer)
Sequence No. 56	合成DNA (リンカー) : H' -S-H-S-P-S1 (36mer)
Sequence No. 57	合成DNA (リンカー) : H' -S-H-S-P-S2 (36mer)
Sequence No. 58	合成DNA (リンカー) : S-B-E1 (35mer)
Sequence No. 59	合成DNA (リンカー) : S-B-E2 (35mer)
Sequence No. 60	合成DNA (プライマー) : M11- Sfi (30mer)
Sequence No. 61	合成DNA (プライマー) : M11-5RB (30mer)
Sequence No. 62	合成DNA (プライマー) : M11-5C (30mer)
Sequence No. 63	合成DNA (プライマー) : M11- KRA (30mer)
Sequence No. 64	合成DNA (プライマー) : pCMV- 1 (30mer)
Sequence No. 65	合成DNA (プライマー) : pPec1R (30mer)
Sequence No. 66	合成DNA (プライマー) : pCMV-o1 (30mer)
Sequence No. 67	合成DNA (プライマー) : pCMV-R1 (30mer)
Sequence No. 68	合成DNA (プライマー) : pGHP-F (29mer)
Sequence No. 69	合成DNA (プライマー) : pGHP-R (30mer)
Sequence No. 70	合成DNA (リンカー) : Linker1 (23mer)
Sequence No. 71	合成DNA (リンカー) : Linker2 (23mer)
Sequence No. 72	合成DNA (リンカー) : Liker3 (16mer)
Sequence No. 73	合成DNA (リンカー) : Liker4 (12mer)
Sequence No. 74	合成DNA (プライマー) : PolyA-SfiF2 (30mer)
Sequence No. 75	合成DNA (プライマー) : PolyA-SalKpn (30mer)
Sequence No. 76	合成DNA (プライマー) : 40KS-B (22mer)
Sequence No. 77	合成DNA (プライマー) : pMG40K-1 (30mer)
Sequence No. 78	改変MG C3抗原(M11-BTR) (アミノ酸)
Sequence No. 79	改変mgc3遺伝子(M11-BTR) (DNA)

## 請 求 の 範 囲

1. NXB (Nはアスパラギン、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸、Bはセリンまたはスレオニンである) をコードするDNA領域の少なくとも一つが、真核細胞内での発現時にN-グリコシル化が生じないように改変されている原核細胞由来のDNA分子。

2. 前記N-グリコシル化を生じさせないための改変が、

(1) アスパラギン (N) をコードするDNA配列の、アスパラギン以外のアミノ酸をコードするDNA配列への改変；

(2) プロリン以外の任意のアミノ酸 (X) をコードするDNA配列の、プロリンをコードするDNA配列への改変；及び

(3) セリンまたはスレオニン (B) をコードするDNA配列の、セリンおよびスレオニン以外のアミノ酸をコードするDNA配列への改変；

のいずれか1以上である請求項1記載のDNA分子。

3. 前記原核細胞由来のDNA分子が抗原蛋白質をコードするDNAである請求項1記載の改変されたDNA分子。

4. 前記原核細胞が、マイコプラズマである請求項1記載の改変されたDNA分子。

5. 前記原核細胞由来のDNA分子が、配列番号1または2に記載されたDNA配列を有するマイコプラズマ由来のDNAである、請求項1記載の改変されたDNA分子。

6. 請求項1記載の改変されたDNA分子のN末端側にシグナル配列をコードするDNAが、融合蛋白質として発現するよう連結されている融合DNA分子。

7. 前記シグナル配列をコードするDNAが、NXB (Nはアスパラギン、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸、Bはセリンまたはスレオ

ニンである) をコードするDNA領域を含んで成る前記シグナル配列をコードするDNAの、当該領域の少なくとも一つが、真核細胞内での発現時にN-グリコシル化が生じないように改変されている、請求項6記載の融合DNA分子。

8. 前記シグナル配列がマレックウイルスのgB由来のシグナル配列または狂犬病ウイルスgG由来のシグナル配列である請求項6記載の融合DNA分子。

9. 前記原核細胞由来のDNA分子が、マイコプラズマ由来の配列番号1または2に記載されたDNA配列を有し、そして前記シグナル配列が、マレックウイルスのgB由来のシグナル配列または狂犬病ウイルスgG由来のシグナル配列である請求項6記載の融合DNA分子。

10. (1) NXB (Nはアスパラギン、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸、Bはセリンまたはスレオニンである) をコードするDNA領域の少なくとも1つが、真核細胞内での発現時にN-グリコシル化が生じないように改変されている原核細胞由来のDNA分子; または

(2) 当該改変されているDNA分子のN末端側にシグナル配列をコードするDNAが、融合蛋白質として発現するよう連結されてなる融合DNA分子;

を組み込んだ組み換えウイルス。

11. 前記N-グリコシル化を生じさせないための改変が、

(1) アスパラギン(N) をコードするDNA配列の、アスパラギン以外のアミノ酸をコードするDNA配列への改変;

(2) プロリン以外の任意のアミノ酸(X) をコードするDNA配列の、プロリンをコードするDNA配列への改変; 又は

(3) セリンまたはスレオニン(B) をコードするDNA配列の、セリンおよびスレオニン以外のアミノ酸をコードするDNA配

列への改変；

のいずれか 1 以上である請求項10記載の組み換えウイルス。

12. 前記原核細胞由来のDNA分子が、配列番号 1 または 2 に記載されたDNA配列を有するマイコプラズマ由来のDNA分子である、請求項10記載の組み換えウイルス。

13. NXB（Nはアスパラギン、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸、Bはセリンまたはスレオニンである）をコードするDNA領域の少なくとも一つが真核細胞内での発現時にN-グリコシル化が生じないように改変されている原核細胞由来のDNA分子のN末端側に、真核細胞内での発現時にN-グリコシル化が生じないように改変されたシグナル配列をコードするDNAが、融合蛋白質として発現するよう連結されてなる融合DNA分子を組み込んだ組み換えウイルス。

14. 前記シグナル配列がマレックウイルスのgB遺伝子由来のシグナル配列または狂犬病ウイルスgG遺伝子由来のシグナル配列である請求項13記載の組み換えウイルス。

15. 前記ウイルスがポックスウイルスまたはヘルペスウイルスである請求項10または13に記載の組み換えウイルス。

16. 前記ウイルスが、鳥類に感染するウイルスである請求項10または13に記載の組み換えウイルス。

17. 前記ウイルスがアビポックスウイルスである請求項10または13に記載の組み換えウイルス。

18. 前記ウイルスがマレックウイルス 1 型、2 型または 3 型である請求項10または13に記載の組み換えウイルス。

19. 改変された蛋白質又はそれを含んで成る融合蛋白質の生成方法において、

（1）NXB（Nはアスパラギン、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸、Bはセリンまたはスレオニンである）をコードするDNA領域の

少なくとも一つが真核細胞内での発現時にN-グリコシル化が生じないように改変されている原核細胞由来のDNA分子を組み込んだ組み換えウイルス；または

(2) 前記改変されたDNA分子のN末端側にシグナル配列をコードするDNAが、融合蛋白質として発現するよう連結されてなる融合DNA分子を組み込んだ組み換えウイルス；

を用いて、真核細胞内で、当該改変してなるDNA分子又は当該融合DNA分子によってコードされた蛋白質を発現させることを含んで成る方法。

20. 請求項10または13に記載の組み換えウイルスを含むワクチン

。

090457-07101  
T0120245660

## 要 約 書

NXB（Nはアスパラギン、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸、Bはセリンまたはスレオニンである）をコードするDNA領域の少なくとも一つが、真核細胞内での発現時にN-グリコシル化が生じないように改変されている原核細胞由来のDNA分子が提供され、このDNA分子はN-グリコシル化部位が改変されているので、N-グリコシル化されていない蛋白質を生成し、例えば原核生物由来の抗原蛋白質を真核生物において生成せしめた場合に、高い免疫原性を発揮する。

090152-07404  
T0120"225T0650